



**UNIVERSIDAD CARLOS III DE MADRID**

## **TESIS DOCTORAL**

# **Estudios sobre la Tomografía Óptica Difusiva de Fluorescencia**

**Autor:**

**Juan Aguirre Bueno**

**Director/es:**

**Juan José Vaquero López**

**Jorge Ripoll Lorenzo**

**DEPARTAMENTO DE MATEMÁTICAS**

**Leganés, Febrero de 2012**



***TESIS DOCTORAL***

**Estudios sobre la Tomografía Óptica Difusiva de  
Fluorescencia**

**Autor: Juan Aguirre Bueno**

**Director/es: Juan José Vaquero López.  
Jorge Ripoll Lorenzo**

Firma del Tribunal Calificador:

Firma

Presidente: (Nombre y apellidos)

Vocal: (Nombre y apellidos)

Vocal: (Nombre y apellidos)

Vocal: (Nombre y apellidos)

Secretario: (Nombre y apellidos)

Calificación:

Leganés/Getafe, de de



## Agradecimientos

En primer lugar me gustaría dar mi más sincero agradecimiento a Manuel Desco y Juan José Vaquero. Mientras que la mayoría de los investigadores con gran esfuerzo apenas llegamos a dominar nuestros reducidos campos de investigación, Manuel Desco sencillamente es experto en el de todos. Además, es de los poquísimos directores de laboratorio que conozco que se ocupa personalmente de que los estudiantes se formen. Estos dos factores unidos hacen que uno tenga la oportunidad de aprender mucho más de lo que esperaría durante el desarrollo de su tesis. Sus aportaciones a este trabajo han sido muy importantes.

Siempre le estaré agradecido a Juan José Vaquero por su sabiduría, experiencia y paciencia en los difíciles momentos en lo que a mí más me faltaron. Su despacho siempre ha estado abierto a mis numerosas dudas y sus aportaciones a este trabajo han sido especialmente valiosas. Ha sido un placer tenerle de director de tesis.

Mis agradecimientos a Jorge Ripoll son también muy hondos. Con gran generosidad me ha enseñado todos los secretos de la Tomografía Óptica, algunos de los cuales él mismo ha tenido a bien descubrir. Pocas veces he estado más cerca de la felicidad que el año que pasé bajo su tutela en Creta, entre experimentos imposibles, windsurf en Kuremenos y discusiones científicas en el Guernica Bar.

Durante estos años he tenido la oportunidad de trabajar en un grupo de investigación en el que he sido absolutamente feliz, con gente a la que tengo que agradecer muchas cosas: a Juan Abascal dos años de intensa y fructífera colaboración. Le debo algunas de las simulaciones presentadas en este escrito. Sus denodados esfuerzos por hacerme entender los pormenores del mundo de los problemas inversos mal condicionados son muy de agradecer (también los de Judit Chamorro). Alejandro Sisniega me ha enseñado de todo, porque sabe de todo, la parte CT de uno de los prototipos presentados en este trabajo es obra suya. Verónica García me ha ayudado siempre, en las múltiples ocasiones que la he necesitado, con sus formidables conocimientos sobre programación y tratamiento de imágenes. El gran Eduardo Lage me ha dado varias clases magistrales sobre bits, bytes y programación de hardware. A Eugenio Marinetto y a Cristina Chavarrías tengo que agradecerles generosas e inteligentes correcciones a esta tesis.

Quiero mencionar también a Paula Montesinos, José María Mateos, Marina Benítez y Natalia Sánchez por su paciencia infinita, y las numerosas manos que me han echado en toda clase de asuntos (también a Cristina claro). A Yasser Aleman le tengo que dar gracias por el experimento más audaz y con resultado más pobre que he hecho en mi corta vida investigadora. Las ocasiones que he trabajado con Mónica Abella han sido siempre muy divertidas y particularmente instructivas para mí. La ayuda de Enrique Crespo con drivers, láseres y circuitos electrónicos ha sido decisiva. Por último, las aportaciones a esta tesis de Alexandra de Francisco y Ángela Camacho han sido fundamentales: ellas se han encargado del manejo de animales para los experimentos correspondientes.

Con el resto de integrantes del laboratorio no he tenido la ocasión de trabajar codo con codo, pero de todos he aprendido mucho, y a todos les tengo algo que agradecer: Javier Navas, Javier Pascau, María Lacalle, Carmen Villalba, Fidel Alfaro, Claudia Molina, Aurora del Olmo, Juan José Sánchez, Marco Rivas, Trajana Garrido (subdirectora del laboratorio), Eva Alarcón, Elena Martino, Marisa Soto, Carlos Crespillo y Lorena Cussó.

Quiero mostrar unos agradecimientos muy especiales para Santiago Reig. Como experto en estadística multivariante me ayudó en varias ocasiones. Su inigualable sentido del humor hacia de las visitas a su despacho una actividad divertidísima. Algunas veces tuve el placer de recibir su consejo y siempre me fue útil. Para todos nosotros Santi siempre será “Un Grande”. Me gustaría agradecer a Juan Enrique Ortuño su ayuda realizando la calibración del FDOT-CT. Las expertas manos de Abraham Martín manejando ratones y realizando experimentos de FACS han sido imprescindibles para la realización de esta tesis.

Pocos doctorandos tienen la fortuna de contar con los consejos de la Dra. Dña. María Dolores Vila-Coro. Su fuerza e inteligencia han sido siempre una fuente de inspiración para mí.

De muchas maneras son responsables de esta tesis mis antiquísimos amigos y amigas, que desde hace décadas son mis hermanos de facto (ellos saben quienes son).

Huelga decir que este documento hubiera sido imposible sin mi hermano Alejandro, mi Padre y mi Madre, mis referentes de lejos más importantes y los “más culpables” de todo esto.

Para terminar quiero darle las gracias a Ana. En este caso, como en el resto de facetas de mi vida, es necesario subrayar aquello de “both authors contributed equally to this paper”. Sin ella las cosas se distorsionan y pierden su interés.

Juan Aguirre

Enero 2012

## **Acknowledgments**

I would like to thank Simon Arridge and Teresa Correia for a nice and fruitful collaboration. I would like to thank Arjun Yodh for giving me the opportunity of joining his great research group.





*A mis dos hijas.*



## Resumen

*La Tomografía Óptica Difusiva de Fluorescencia (FDOT) es una técnica de imagen molecular de reciente creación, que ha atraído fuertemente la atención de la comunidad de investigadores biomédicos “preclínicos”, pues utiliza radiación no ionizante y su coste es muy bajo. La conjunción de estos factores la perfilan como una alternativa posible al paradigma nuclear en la investigación con animales pequeños.*

*Debido a la juventud de la técnica, se plantean numerosos interrogantes que abarcan desde sus áreas de aplicación al discurrir de su desarrollo tecnológico. Es la intención de este trabajo dar respuesta a algunos de ellos.*

*En lo que concierne al desarrollo tecnológico hemos construido un FDOT de geometría de placas paralelas que utiliza un reconstructor optimizado. Posteriormente el sistema ha sido clonado, incluyéndose en el gantry rotatorio de un tomógrafo de rayos X (CT).*

*Usando estos dispositivos hemos querido resolver dos cuestiones técnicas relevantes: la primera relativa al grado de detalle necesario en el modelo matemático de transporte de luz. Este modelo alimenta el algoritmo de reconstrucción y habitualmente se construye suponiendo que los sujetos tienen propiedades ópticas homogéneas, junto con el uso de datos normalizados. Hemos demostrado que esta asunción no es válida en presencia de heterogeneidades de dispersión. La segunda cuestión hace referencia a la geometría del montaje experimental, demostrando que la adquisición en placas paralelas es capaz de proporcionar reconstrucciones de mejor calidad que la adquisición en rotación.*

*En lo referente a las áreas de aplicación, en este documento demostramos la capacidad de la técnica para cuantificar in-vivo la concentración de células T fluorescentes en los ganglios cervicales y en el timo de ratones transgénicos.*



# ÍNDICE

<b>1. MOTIVACIÓN, OBJETIVOS Y ESQUEMA DE LA TESIS .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN A LA TÉCNICA FDOT .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Modelado matemático de la propagación de luz en medios biológicos: dispersión y absorción.....</b>	<b>5</b>
2.1.1 Transporte, la ecuación de transferencia radiativa.....	7
2.1.2 Difusión .....	9
2.1.3 Soluciones analíticas de la ecuación de difusión, medios homogéneos.....	11
2.1.4 Tratamiento numérico, medios heterogéneos .....	14
2.1.5 Problema directo, problema inverso y normalización de datos .....	15
<b>2.2 Estado de la técnica, sistemas FDOT .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Factores intrínsecos de emborronamiento en las reconstrucciones .....</b>	<b>20</b>
<b>3. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA FDOT .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Introducción.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Material y Métodos.....</b>	<b>24</b>
3.2.1 Descripción del sistema FDOT.....	24
3.2.3 El problema inverso, algoritmo de reconstrucción ART .....	27
3.2.4 Caracterización de la resolución y el ruido.....	27
3.2.5 Caracterización de la precisión de la cuantificación.....	30
3.2.6 Imagen de ratón.....	31
<b>3.3. Resultados .....</b>	<b>32</b>
3.3.1 Caracterización de la resolución y el ruido .....	32
3.3.2 Caracterización de la capacidad de cuantificación.....	33
3.3.3 Reconstrucción de ratón.....	34
<b>3.4. Discusión.....</b>	<b>35</b>
3.4.1 Valores óptimos de relajación y número de iteraciones.....	35
3.4.2 Caracterización de la resolución, ruido y capacidad de cuantificación.....	36
3.4.3 Imagen de ratón .....	36
<b>3.5 Conclusión.....</b>	<b>37</b>
<b>4. INFLUENCIA DEL COEFICIENTE DE DISPERSIÓN EN LA RECONSTRUCCIÓN FDOT USANDO DATOS NORMALIZADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Introducción.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2 Material y Métodos.....</b>	<b>41</b>
4.2.1 Análisis matemático: Medio infinito y geometría ladrillo.....	41
4.2.2 Construcción del maniquí, protocolo de adquisición y simulación .....	44

4.2.3 Reconstrucción del maniquí.....	46
4.2.4 Simulación del modelo de ratón .....	46
4.2.3 Reconstrucción del modelo de ratón.....	47
4.2.4 Cuantificación.....	48
<b>4.3 Resultados .....</b>	<b>48</b>
4.3.2 Maniquí tipo ladrillo: Experimentos y simulaciones .....	48
4.3.2 Ratón con diferentes tejidos.....	51
<b>4.4 Discusión y conclusiones .....</b>	<b>52</b>
<b>5. FDOT-CT. ....</b>	<b>55</b>
<b>5.1 Introducción.....</b>	<b>55</b>
<b>5.2 Materiales y métodos.....</b>	<b>58</b>
5.2.1 Diseño del sistema FDOT/CT.....	58
5.2.2 Subsistema FDOT.....	60
5.2.3 Subsistema CT .....	61
5.2.4 Experimento con maniquí (E1).....	62
5.2.5 Experimento con ratón (E2).....	62
5.2.6 Simulaciones adquisición en placas paralelas vs adquisición en rotación. ....	63
5.2.6.1 Justificación de las simulaciones .....	63
5.2.6.2 Simulación cilindro (S1,S2,S3,S4) vs ladrillo (S5,S6,S7,S8) .....	63
5.2.6.3 Simulación ratón (S9,S10) sin comprimir vs ratón comprimido (S7,S8).....	65
<b>5.3 Resultados .....</b>	<b>71</b>
5.3.1 Experimento con maniquí (E1) y con ratón (E2) .....	71
5.3.3 Adquisición en rotación vs placas paralelas .....	73
<b>5.4 Discusión y conclusiones .....</b>	<b>79</b>
<b>6. APLICACIÓN DE FDOT PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS T FLUORESCENTES IN-VIVO. ....</b>	<b>81</b>
<b>6.1 Introducción.....</b>	<b>81</b>
<b>6.2 Materiales y métodos.....</b>	<b>82</b>
6.2.1 Montaje experimental .....	82
6.2.2 Manipulación de animales y adquisición de datos FDOT .....	84
6.2.3 Reconstrucción y cuantificación FDOT.....	85
6.2.4 Citometría de flujo.....	86
<b>6.3 Resultados .....</b>	<b>86</b>
<b>6.4 Discusión y conclusiones .....</b>	<b>89</b>
6.4.1 FDOT como instrumento cuantitativo .....	89
6.4.2 El problema de la cuantificación interórgano. ....	89
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>91</b>
<b>8. LÍNEAS FUTURAS .....</b>	<b>93</b>

<b>APÉNDICES .....</b>	<b>95</b>
1) Tratamiento numérico de la ecuación de difusión fotónica mediante el método de los elementos finitos. ....	95
2) Descomposición en valores singulares, regularización de Tikhonov y análisis de valores singulares. ....	97
3) Usos de la información a priori en el problema inverso .....	99
4) Registro de imágenes mediante SVD. ....	100
5) Programas de adquisición y reconstrucción .....	102
5.1 Programas de adquisición .....	102
5.2 Programa de reconstrucción.....	104
<b>PUBLICACIONES DERIVADAS DEL TRABAJO DE LA TESIS .....</b>	<b>105</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>107</b>





## Capítulo 1

### 1. Motivación, objetivos y esquema de la Tesis

En las últimas décadas, con el auge de la imagen molecular, las máquinas de imagen médica tanto en su versión clínica como preclínica, han experimentado una transformación conceptual rotunda, llegando mucho más allá de la simple observación de estructuras anatómicas de manera no invasiva. Técnicas como la tomografía por emisión de positrones (PET), la tomografía por emisión de fotón único (SPECT) o la imagen por resonancia magnética (MRI) son capaces de caracterizar y medir in vivo procesos biológicos a nivel celular y molecular [1-2]

El paradigma metodológico de la imagen molecular se sostiene en el concepto de sonda, que es aquella molécula o compuesto dotado de dos vectores, uno de afinidad, que permite que se asiente en el objetivo biológico, y otro de detectabilidad, que permite la medición no invasiva de su distribución y concentración usando la técnica pertinente [1-2]

Desde hace dos décadas y hasta hoy se está experimentando un notable desarrollo de las llamadas sondas fluorescentes. Su vector de detectabilidad es el fluoróforo, que se define como una molécula capaz de absorber luz a una longitud de onda determinada y emitir a una longitud de onda ligeramente mayor. Estas moléculas se pueden unir a una variedad enorme de vectores de afinidad (virus, dendrímeros, cadenas polipeptídicas y más) sirviendo de contraste para un amplio abanico de objetivos biológicos como: expresión de proteasa (apoptosis, inflamación), angiogénesis, o microcalcificaciones óseas entre muchas otras. Por otra parte, los avances en ingeniería genética han permitido controlar la expresión de proteínas fluorescentes en células específicas [3-4] , permitiendo marcar estructuras subcelulares, grupos de células concretos, o seguir la pista de la expresión génica mediante la técnica del gen reportero [5-6].

Paralelamente al desarrollo de los marcadores fluorescentes, que han revolucionado el campo de la microscopía, se han producido grandes avances en la comprensión del viaje de la luz a través de tejidos biológicos, instaurándose un marco matemático útil con el que poder modelar este

proceso macroscópicamente [7-14]. Estos factores unidos al desarrollo de la tecnología fotográfica CCD de alta sensibilidad, han permitido a las sondas fluorescentes dar el salto de lo micro a lo macro, con la aparición de una familia nueva de sistemas de imagen molecular e imagen funcional: las llamadas técnicas de imagen óptica [6, 10, 15-16].

Estos sistemas comparten un denominador común, usan radiación no ionizante, superando la gran contrapartida de otras técnicas de imagen molecular clásicas (PET, SPECT) y su coste por lo general es muy bajo, no solo debido al aparataje, sino porque las sondas fluorescentes normalmente son sencillas y baratas de sintetizar.

De entre este conjunto de técnicas, la tomografía óptica difusiva de fluorescencia (FDOT) ha captado gran interés en la comunidad de investigadores biomédicos, debido a que permite obtener la distribución espacial 3D de la concentración de fluoróforos en animales pequeños.

Heredera de la técnica de tomografía óptica difusiva (DOT) [10, 13, 17-18], usada para detectar inhomogeneidades ópticas en los parámetros ópticos intrínsecos en tejido humano, el primer prototipo para investigación preclínica en animales pequeños aparece en 2002 [19], por lo que está en pleno desarrollo tecnológico, habiendo muchas cuestiones abiertas a discusión y en investigación.

Por un lado, el modelado matemático del transporte fotónico en el sujeto es crucial para el éxito de la técnica, y no hay consenso sobre el grado de detalle necesario en el modelo para su buen funcionamiento, existiendo múltiples aproximaciones al problema [13, 20-26].

También, debido a que la técnica no ofrece información anatómica, se están desarrollando sistemas híbridos que combinen la FDOT con técnicas de gran resolución espacial, como CT o MRI [27-29]. Además, la información anatómica proporcionada por estas técnicas se postula como útil en la mejora del modelado matemático de la propagación fotónica y del algoritmo de reconstrucción tomográfica.

Ocurre también que los varios sistemas desarrollados hasta ahora poseen geometrías de adquisición diferentes, por lo que una parte del esfuerzo investigador se destina a encontrar la geometría que ofrezca una mejor calidad en las imágenes reconstruidas [30-34].

Por último, debido a las características del transporte fotónico en tejidos vivos, la técnica solo es capaz de resolver con éxito la distribución de fluoróforo para condiciones concretas de especificidad y distribución, luego la búsqueda de preguntas biomédicas para las que la FDOT pueda dar respuesta es constante [19, 35-42].

El objetivo general de la tesis ha sido contribuir al avance de la técnica FDOT. Los objetivos específicos han pretendido dar respuesta a las cuestiones del estado de la técnica expuestas anteriormente y han sido los siguientes:

1. Diseño, implementación y evaluación de un demostrador FDOT de placas paralelas y optimización del algoritmo de reconstrucción ART (del inglés Algebraic Reconstruction Technique)(capítulo 3).
2. Estudio de la influencia del modelado matemático del transporte fotónico en la calidad de la reconstrucción (capítulo 4).
3. Implementación del sistema FDOT en el gantry de un tomógrafo de rayos X. Estudio de la calidad de la imagen reconstruida en función de la geometría de adquisición (placas paralelas vs rotatoria) (capítulo 5).
4. Estudio de la capacidad de la técnica FDOT para cuantificar la concentración de células T fluorescentes en los ganglios cervicales y el timo de ratones transgénicos (capítulo 6).

La organización del documento es la siguiente: en el capítulo 2 se hace una introducción a la técnica FDOT en la que se revisa el marco matemático necesario para la comprensión de los algoritmos de reconstrucción, se describe el estado de la técnica FDOT haciendo una recapitulación de los sistemas desarrollados hasta el momento y se describen los factores más importantes que influyen en la calidad de las imágenes. En los capítulos 3,4,5,6 se desgranar los objetivos 1,2,3,4 de la tesis respectivamente, siguiendo cada uno la organización canónica de un artículo de investigación. En el capítulo 7 se resumen las conclusiones de los trabajos y en el 8 se detallan las líneas futuras de investigación.



## Capítulo 2

### 2. Introducción a la técnica FDOT

*En este capítulo resumimos los aspectos teóricos y experimentales básicos de la técnica FDOT. Comenzaremos con el modelado matemático del transporte fotónico en medios biológicos, que es el cimiento que utilizaremos para derivar las ecuaciones que conforman el problema de reconstrucción tomográfica. Posteriormente se revisan las máquinas desarrolladas por diferentes grupos investigadores hasta el momento, resaltando sus ventajas y desventajas técnicas. El final se reserva para enumerar los factores intrínsecos que determinan la calidad de las reconstrucciones obtenidas con esta técnica.*

#### **2.1 Modelado matemático de la propagación de luz en medios biológicos: dispersión y absorción.**

Los tejidos biológicos son una amalgama no uniforme y dinámica de todo tipo de partículas de tamaños muy variables. A modo de ejemplo, las mitocondrias tienen 1-2  $\mu\text{m}$  de longitud, los ribosomas 20-30nm de anchura, una célula 30 $\mu\text{m}$  de diámetro (en media), y una célula de grasa 120  $\mu\text{m}$  de diámetro [43]. Esto supone que un haz de <sup>\*</sup>luz en el infrarrojo cercano viajando por tejidos, incide constantemente con objetos cuyos tamaños varían entre una centésima parte de su longitud de onda ( $\lambda/100$ ) hasta  $100\lambda$  o  $1000\lambda$ . Cuando la radiación interactúa con átomos y moléculas organizadas en tamaños que guardan estas proporciones con su  $\lambda$ , se producen una enorme cantidad de eventos de <sup>†</sup>dispersión y en el caso específico de los tejidos biológicos, también una gran cantidad de absorción [44-45]. Si un medio interactúa de este modo con la radiación, se suele referir a él como medio turbio o medio difusivo [11].

Estas características (dinamismo, morfología heterogénea, alta dispersión) hacen que sea difícil llegar a una descripción matemática manejable del fenómeno en función de parámetros deterministas desarrollando las ecuaciones de Maxwell. Por ello, es necesario abordar el

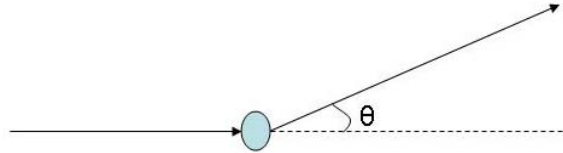
---

<sup>\*</sup> En la jerga de la física, el termino *luz* se suele aplicar para la radiación electromagnética con longitud de onda comprendida desde el violeta ~380-450nm hasta el infrarrojo cercano ~700-1000nm. Nos ceñiremos a esta definición en el transcurso del manuscrito.

<sup>†</sup> Son muchas las definiciones de dispersión. En el contexto de esta tesis es el cambio de dirección de la propagación de la onda, sin pérdidas radiativas.

problema desde un punto de vista estadístico usando la ecuación de transferencia radiativa (RTE), en la que se manejan magnitudes como la densidad fotónica media o el recorrido libre medio [11, 46-47].

Bajo el modelo microscópico asociado a estas ecuaciones macroscópicas, se puede entender la luz como fotones asociados a una energía que viajan por el medio cambiando de dirección al interaccionar con partículas dispersoras o siendo absorbidos (*figura 2.1*).



**Figura 2.1.** Representación de un evento de dispersión. La esfera coloreada representa la partícula dispersora mientras que las flechas representan la dirección de propagación del fotón antes y después del evento. El ángulo de dispersión es  $\theta$ .

El ángulo de dispersión,  $\theta$ , se modela estadísticamente con la función de densidad de probabilidad de Henyey-Greenstein [48], que se escribe como:

$$p(\cos \theta) = \frac{(1 - g^2)}{(1 + g^2 - 2g \cos \theta)} \quad (1.1)$$

Donde  $g$  es el factor de anisotropía. Haciendo un pequeño calculo se deduce que  $\langle \cos \theta \rangle = g$ ; es decir, el valor esperado del coseno del ángulo de dispersión es igual al factor de anisotropía, si  $g$  toma valores cercanos a 1,  $\theta$  los toma cercanos a 0 y la dispersión tiene claramente una dirección preferente.

El coeficiente de dispersión,  $\mu_s$  se define como la inversa del recorrido libre medio de un fotón  $l_{sc}$ , que es la distancia característica entre dos eventos de dispersión [49-50].

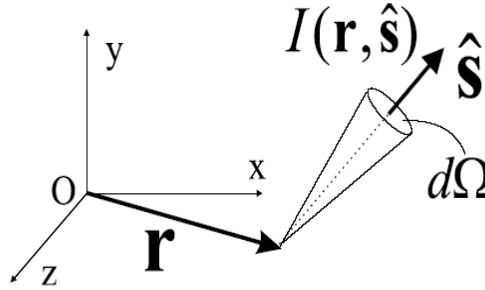
$$\mu_s = \frac{1}{l_{sc}} \quad (1.2)$$

El coeficiente de absorción  $\mu_a$  se define como la inversa de la distancia para la cual la intensidad de la luz decae un factor  $I = \exp(-\mu_a \cdot r)$ .

### 2.1.1 Transporte, la ecuación de transferencia radiativa

En esta sección y en la 2.1.2 desarrollaremos resumidamente el modelo de la RTE y la aproximación de difusión. El lector interesado encontrará en los capítulos 2, 3 y 4 de [11] una de las revisiones más completas y rigurosa desde el punto formal. Los capítulos 2 y 3 de [10] y [51] son resúmenes excelentes para un lector con perfil menos matemático. Esta sección y la 2.1.2 están basadas en estas publicaciones.

La magnitud que describe el flujo de energía lumínica y su interacción con el medio es la intensidad específica  $I(r,s)$  [11] que representa el flujo de potencia media en un punto  $r$  que fluye en la dirección  $s$  (figura 2.2). Sus unidades son  $[Wcm^{-2}sr^{-1}]$ .



**Figura 2.2.** Presentación grafica de la intensidad específica  $I$  que fluye en la dirección  $s$  [11].

El principio de conservación afirma que la variación temporal de energía en un volumen elemental  $dV$  es igual al flujo de energía en la superficie que engloba ese volumen más la ganancia o pérdida de energía en  $dV$ . Para la intensidad específica, esta ley se expresa matemáticamente como [46-47]:

$$\frac{n}{c} \frac{\partial I(r, \hat{s}, t)}{\partial t} = -\hat{s} \cdot \nabla I(r, \hat{s}, t) - (\mu_a + \mu_s) I(r, \hat{s}, t) + \frac{\mu_t}{4\pi} \int_{4\pi} p(\hat{s}, \hat{s}') I(r, \hat{s}', t) d\Omega' + \varepsilon(r, \hat{s}) \quad (1.3)$$

Donde  $n$  es el índice de refracción,  $c$  es la velocidad de la luz en el vacío,  $p(\hat{s}, \hat{s}')$  es la función de fase que representa la densidad de probabilidad relativa al cambio en la dirección de propagación fotónica de  $\hat{s}'$  a  $\hat{s}$  y  $\varepsilon$  el término de la fuente\*.

Leyendo los términos de la ecuación (1.3) de izquierda a derecha se tiene que en un elemento de volumen la variación temporal de la intensidad específica en una determinada dirección  $s$ , es igual al flujo neto en las paredes del elemento de volumen menos las pérdidas por absorción y

\* Ver [44] para una descripción rigurosa del índice de refracción y la función de fase

dispersión más la ganancia por la intensidad específica que por dispersión se añade a la dirección de interés, más las contribuciones debidas a la existencia de fuentes.

La energía que sale de un elemento de área  $dS$  por un elemento de ángulo sólido  $d\Omega$  en un instante de tiempo  $dt$  es  $I \cdot dS \cdot d\Omega \cdot dt$ . Esta energía ocupará un volumen  $dS \cdot v \cdot dt$ , donde  $v$  es la velocidad de propagación de la radiación. A partir de estas expresiones se deduce la densidad de energía por diferencial de ángulo sólido  $du$  [11]:

$$du = \frac{I(r, \hat{s}, t) \cdot dS \cdot d\Omega \cdot dt}{v \cdot dS \cdot dt} = \frac{I(r, \hat{s}, t) d\Omega}{v} \quad (1.4)$$

$du$  tiene unidades de  $[Jcm^{-3} sr^{-1}]$ . Sumando las energías debidas a las contribuciones de todas las direcciones, obtenemos la densidad de energía media:

$$u(r) = \frac{n}{c} \int_{4\pi} I(r, \hat{s}, t) d\Omega \quad (1.5)$$

Donde  $u$  tiene unidades de  $[Jcm^{-3}]$ . Para obtener la densidad fotónica  $N(r)$ , basta con hacer  $N(r) = u(r)/h\nu$  donde  $h$  es la constante de Planck y  $\nu$  la frecuencia del fotón, siempre y cuando la fuente de fotones sea monocromática. La intensidad media,  $U$  y el flujo total  $J$  se definen como:

$$U(r) = \int_{4\pi} I(r, \hat{s}, t) d\Omega \quad (1.6)$$

$$J(r) = \int_{4\pi} I(r, \hat{s}, t) \hat{s} d\Omega \quad (1.7)$$

$U(r)$  y  $J(r)$  tienen unidades de  $[W/Cm^2]$ .

$U(r)$  y  $u(r)$  se relacionan mediante una constante, por lo tanto, sin pérdida de rigor, nos referiremos a  $U(r)$  y a  $J(r)$  como la densidad fotónica y flujo de densidad fotónica respectivamente. Para hacer la conversión basta con multiplicar por  $(n/c) \cdot h\nu$ . Esto es válido para medios cuyo índice de refracción se pueda asumir constante. Una vez descritas estas magnitudes, integrando la ecuación (1.3) sobre todos los ángulos sólidos, podemos escribir la RTE en su forma diferencial:

$$\frac{1}{c} \frac{\partial U(r, t)}{\partial t} = E(r) - \nabla \cdot J(r, t) - \mu_a U(r, t) \quad (1.8)$$



Las expresiones (1.3) y (1.8) son las ecuaciones del transporte fotónico en medios turbios, sin embargo, su naturaleza integro-diferencial complica su tratamiento analítico y numérico. En la siguiente sección aproximaremos la ecuación del transporte a una ecuación de difusión. Esta nueva expresión admite soluciones analíticas para determinadas geometrías y permite un tratamiento numérico sencillo.

### 2.1.2 Difusión

La forma más común de abordar la expresión 1.8 para hacerla matemáticamente más manejable sin perder rigor en las soluciones, consiste en expandir la intensidad específica en series de armónicos esféricos. Quedándonos con los  $N$  primeros términos, el problema se simplifica, obteniendo así la aproximación  $P_N$ .

Para  $N=1$ , la intensidad específica se aproxima mediante la siguiente expresión [14]:

$$I(r, \hat{s}, t) \approx \frac{1}{4\pi} U(r, t) + \frac{3}{4\pi} J(r, t) \cdot \hat{s} \quad (1.9)$$

Para tejidos biológicos, esta aproximación se satisface en la ventana espectral del infrarrojo cercano, donde la absorción es mucho menor que la dispersión (ver sección 2.3). En [52] y en [11] se detallan en profundidad los límites de validez de esta aproximación.

Sustituyendo la ecuación (1.9) en la (1.3), multiplicando por  $\hat{s}$  e integrando a todos los ángulos sólidos obtenemos:

$$\frac{3}{c} \frac{\partial J(r, t)}{\partial t} = -\nabla U(r, t) - \frac{1}{D} J(r, t) \quad (1.10)$$

Donde

$$D = \frac{1}{3[(1-g)\mu_s + \mu_a]} = \frac{1}{3[\mu'_s + \mu_a]} \quad (1.11)$$

$D$  es el coeficiente de difusión y  $g$  es el coeficiente de anisotropía. Para tejidos biológicos  $g \approx 0.9$ , lo que indica que el ángulo de dispersión medio es cercano a 0 y por lo tanto los fotones tienden a conservar su dirección tras cada interacción con las partículas del medio. Sin embargo, después de varios eventos de dispersión, la dirección se vuelve completamente aleatoria, perdiéndose la memoria de la dirección de propagación del fotón antes de la primera dispersión. Debido a esto se define el coeficiente de dispersión reducido  $\mu'_s$  como la inversa de la distancia media que

recorre un fotón antes de sufrir una dispersión en una dirección aleatoria. Esta métrica define al recorrido libre medio de transporte fotónico, siendo su longitud típicamente 1 mm [50] y cumpliéndose que  $\mu'_s = (1 - g)\mu_s$ . Puesto que suponemos que la luz está en la franja energética del infrarrojo cercano, forzosamente  $\mu_a \ll \mu'_s$ , por lo que  $D \approx 1/(3\mu'_s)$  [11]. Haciendo la transformada de Fourier de la ecuación (1.10) y reorganizando los miembros, obtenemos:

$$J(r) = -\frac{cD}{c - 3i\omega D} \nabla U(r) \quad (1.12)$$

Donde  $\omega$  es la frecuencia que modula la intensidad de la fuente. En nuestro caso, la fuente es un láser que opera en modo de amplitud constante, por lo tanto  $\omega = 0$ , y de la ecuación (1.12) se obtiene la ley de Fick, presente en los procesos de difusión:

$$J(r) = -D\nabla U(r) \quad (1.13)$$

Introduciendo (1.13) en la transformada de Fourier de la ecuación (1.8), obtenemos la ecuación de difusión:

$$-\frac{i\omega}{c}U(r) - D\nabla^2 U(r) + \mu_a U(r) = S(r) \quad (1.14)$$

Haciendo  $\omega = 0$  y reagrupando términos, obtenemos finalmente la ecuación de difusión para el proceso estacionario:

$$(\nabla^2 + k^2)U(r) = -\frac{S(r)}{D} \quad (1.15)$$

Donde

$$k = \sqrt{-\frac{\mu_a}{D}} \quad (1.16)$$

Para un medio de propiedades ópticas heterogéneas, es decir, con el coeficiente de absorción y el coeficiente de dispersión dependientes de la posición y usando argumentos análogos a los expuestos en esta sección, se obtiene una expresión general de la ecuación de difusión fotónica en medios turbios:

$$-\nabla \cdot D(r) \nabla U(r) + \mu_a(r) U(r) = q(r_s) \quad (1.17)$$

### 2.1.3 Soluciones analíticas de la ecuación de difusión, medios homogéneos

La ecuación (1.15) se resuelve usando la función de Green satisface [53]:

$$\nabla^2 G(k|r-r'|) + k^2 G(k|r-r'|) = -4\pi\delta(r-r') \quad (1.18)$$

y cuya solución es [53]:

$$G(r, r') = \frac{\exp[-k|r-r'|]}{|r-r'|} \quad (1.19)$$

A partir de la ecuación (1.19), hallamos la solución de la ecuación (1.15), cuya expresión es [53]:

$$U(r) = \frac{1}{4\pi} \int G(r, r') \frac{S(r')}{D} dr' \quad (1.20)$$

Lo que permite escribir la densidad fotónica como la convolución de la función de Green con el término de la fuente. En el caso experimental habitual, la fuente es un láser colimado que incide en la dirección normal a la superficie del medio. Una aproximación aceptable de esta situación consiste en suponer la fuente como puntual e isotrópica, situada a la distancia de un recorrido libre medio en la dirección normal a la superficie.

Si manejamos un medio infinito y homogéneo (i.e.,  $\mu_a$  y  $\mu'_s$  constantes) y suponemos una fuente puntual e isotrópica situada en  $r_s$  cuya ganancia es constante e igual a 1, la ecuación (1.15) se convierte en:

$$(\nabla^2 + k^2)U(r) = -\frac{\delta(r-r_s)}{D} \quad (1.21)$$

Cuya solución se obtiene a partir de las ecuaciones (1.19) y (1.20):

$$U(r) = \frac{\exp[-k|r-r_s|]}{4\pi D|r-r_s|} \quad (1.22)$$

En este caso  $U(r)$  define la densidad fotónica para un medio infinito con propiedades ópticas homogéneas.

Para estudiar las soluciones de la ecuación (1.15) en medios finitos es necesario conocer la condición de frontera entre el medio difusivo y el aire (no difusivo). Esta se deriva de una asunción simple: los únicos fotones que entran en el medio difusivo provienen exclusivamente de las fuentes. En un punto  $r$  de la frontera del medio difusivo con vector normal a la superficie  $\hat{n}$  se definen el flujo que sale del medio  $J^+(r, \hat{n})$  y el que entra  $J^-(r, \hat{n})$  como

$$J^+(r, \hat{n}) = \int_{\hat{s} \cdot \hat{n} > 0} I(r, \hat{s}) \hat{s} \cdot \hat{n} d\Omega \quad (1.23)$$

$$J^-(r, \hat{n}) = \int_{\hat{s} \cdot \hat{n} < 0} I(r, \hat{s}) \hat{s} \cdot \hat{n} d\Omega \quad (1.24)$$

Por lo expuesto anteriormente,  $J^-(r, \hat{n}) = 0$ . Sin embargo hay que tener en cuenta los fotones que llegan a la superficie desde el interior y son reflejados. Este fenómeno esta modulado por los coeficientes de Fresnel [14, 44]. Ahora, el flujo hacia el interior del medio difusivo cumple:

$$\int_{\hat{s} \cdot \hat{n} < 0} I(r, \hat{s}) \hat{s} \cdot \hat{n} d\Omega = \int_{\hat{s} \cdot \hat{n} > 0} R(\hat{s}) I(r, \hat{s}) \hat{s} \cdot \hat{n} d\Omega \quad (1.25)$$

donde  $R$  es el coeficiente de reflexión de Fresnel. Desarrollando la ecuación (1.25) e introduciéndola en la ecuación (1.9), se obtiene la condición de frontera [11]:

$$U(r)|_s = \alpha J_n(r) \quad (1.26)$$

Donde  $\alpha$  es un parámetro que dependen de la diferencia entre el índice de refracción del medio difusivo y el no difusivo. Haciendo uso de la ley de Fick (1.13) obtenemos:

$$U(r)|_s = -C_{nd} \frac{\partial U(r)}{\partial \hat{n}} \Big|_s \quad (1.27)$$

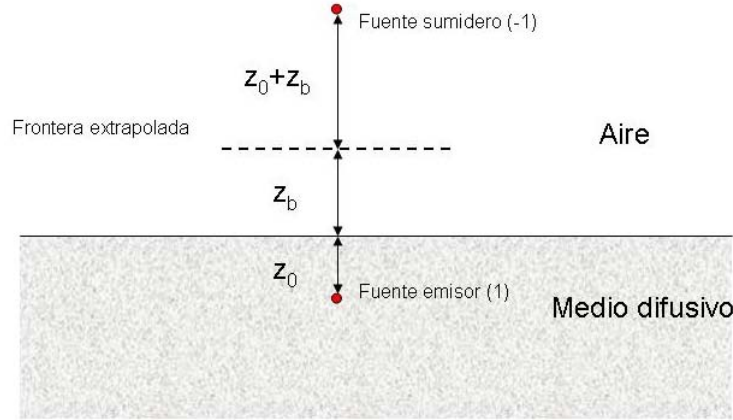
Siendo  $C_{nd} = -D\alpha$ . Esta condición es útil en el tratamiento numérico de la ecuación de difusión, o para obtener soluciones analíticas en el caso de geometrías canónicas (parábola, cilindro, esfera). Para fronteras planas se puede utilizar el principio de superposición para la densidad fotónica. El resultado de superponer las densidades fotónica debidas a fuentes de distinto signo (emisores, pozos), consigue que la condición de frontera se satisfaga [55-56].

Si definimos  $z$  como la distancia en la dirección normal a la superficie, la frontera extrapolada  $z_b$ , cumple:

$$z_b = \frac{2}{3\mu_s} \frac{1+R}{1-R} \quad (1.28)$$

Se ha demostrado que la densidad fotónica resultante de situar una fuente emisora puntual en  $z=z_0$  y una fuente puntual pozo en  $z=-z_0-2z_b$  [55-56] es equivalente a aplicar la condición de frontera expresada en la ecuación (1.27), ver *figura 2.3*. Esta combinación hace cero la densidad fotónica precisamente en  $z=-z_b$ .

La posición de la frontera extrapolada dependerá de la diferencia entre los índices de refracción del medio difusivo y no difusivo, así como del coeficiente de dispersión del medio.



**Figura 2.3.** Distribución de emisores y sumideros a ambos lados de la frontera del medio turbio. Bajo esta distribución particular, la densidad fotónica es cero en la frontera extrapolada.

Matemáticamente la densidad fotónica cumple la expresión [55]:

$$U(\rho, z) = \frac{1}{4\pi D} \left( \frac{\exp(-kr_0)}{r_0} - \frac{\exp(-kr_c)}{r_c} \right) \quad (1.29)$$

Donde

$$r_0 = \sqrt{|z - z_0|^2 + \rho^2} \quad (1.30)$$

$$r_c = \sqrt{|z + z_c|^2 + \rho^2} \quad (1.31)$$

Para una geometría tipo ladrillo\*, en la que existen dos fronteras paralelas planas e infinitas situadas a una distancia L, hay dos fronteras extrapoladas en las que la densidad fotónica debe ser cero. El cumplimiento de la condición de frontera se consigue cancelando los efectos de las fuentes en la frontera opuesta, obteniéndose la siguiente expresión [56]:

$$U(\rho, z) = \frac{1}{4\pi D} \sum_{m=1}^M \left( \frac{\exp(-kR_0(m))}{R_0(m)} - \frac{\exp(-kR_c(m))}{R_c(m)} \right) \quad (1.32)$$

$$R_o(m) = \left( \left( 2 \cdot \text{floor}(m/2) d' + (-1)^{m-1} (z - z_0) \right)^2 + \rho^2 \right)^{1/2} \quad (1.33)$$

$$R_c(m) = \left( \left( 2 \cdot \text{floor}(m/2) d' + (-1)^{m-1} (z + z_c) \right)^2 + \rho^2 \right)^{1/2} \quad (1.34)$$

Donde  $d' = d + 2z_d$

M=6 es suficiente para obtener una aproximación útil para experimentos de FDOT [57].

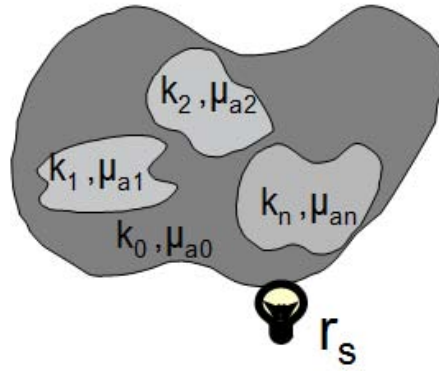
### 2.1.4 Tratamiento numérico, medios heterogéneos

La resolución de la ecuación de difusión es un problema clásico de cálculo numérico. Para el caso concreto de la ecuación de difusión fotónica en FDOT, es común utilizar el método de los elementos finitos (FEM) [12] (ver Apéndice I), ya que los mallados que resultan de aplicar esta técnica frente a otras como el método de las diferencias finitas, se ajustan mejor a geometrías biológicas. Recientemente se ha probado la utilidad del método de los elementos de frontera (BEM) [58],[11] así como aproximaciones híbridas FEM-BEM [59]

Usando el método de los elementos finitos, es posible plantear el problema de una forma realista, asignando a cada tejido coeficientes de absorción y dispersión propios, y usando las condiciones de frontera adecuadas (figura 2.4).

---

\* Hemos traducido de la literatura el termino “slab” por ladrillo.



**Figura 2.4.** Representación de una rodaja axial correspondiente a un sujeto bajo estudio. Las propiedades ópticas son constantes para cada tejido. Hay una fuente de luz en la posición  $r_s$

Desarrollando la ecuación (1.17) con  $D$  y  $\mu_a$  constantes en cada región, se obtiene el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales para  $l=0,1,2,\dots,n$ .

$$(\nabla^2 + k_l^2)U_l(r) = -\frac{q_l(r)}{D_l} \quad (1.35)$$

La condición de frontera entre regiones difusivas es [58],[11] :

$$U_{l-1}|_{r_l} = U_l|_{r_l} \quad (1.36)$$

La condición de frontera entre región difusiva y aire es de tipo Robin:

$$U(r)|_s = -C_{nd} \frac{\partial U(r)}{\partial \hat{n}} \Big|_s \quad (1.37)$$

### 2.1.5 Problema directo, problema inverso y normalización de datos

Según se ha desarrollado en la secciones 2.1.1, 2.1.2 y 2.1.3 para una distribución de sonda fluorescente en medio turbio en el que existe una fuente de luz colimada en la posición  $r_s$ , con longitud de onda  $\lambda_{ex}$  adecuada para excitar a los fluoróforos, se podrán plantear dos ecuaciones de difusión: una para la densidad fotónica creada por el láser, y otra para la densidad fotónica creada por la sonda, usando los términos de fuente adecuados. Para la ecuación de excitación, el término de la fuente corresponderá al láser colimado (ver sección 2.1.3), mientras que para la ecuación de fluorescencia, el término que describe la ganancia y distribución de la fuente será el

producto de la densidad fotónica de excitación por la concentración de fluoróforos<sup>\*</sup>. De esta manera las ecuaciones quedan acopladas en el siguiente sistema [60]:

$$\begin{aligned} -\nabla \cdot D(r, \lambda_{ex}) \nabla U_{ex}(r, \lambda_{ex}) + \mu_a(r, \lambda_{ex}) U_{ex}(r, \lambda_{ex}) &= q_0(r_s) \\ -\nabla \cdot D(r, \lambda_{fl}) \nabla U_{fl}(r, \lambda_{fl}) + \mu_a(r, \lambda_{fl}) U_{fl}(r, \lambda_{fl}) &= F(r) U_{ex}(r, \lambda_{ex}) \end{aligned} \quad (1.38)$$

Donde se han explicitado las dependencias en longitud de onda, ya que los parámetros ópticas varían con ellas. Sin embargo, una aproximación comúnmente utilizada, consiste en asumir que la diferencia entre la longitud de onda de absorción y emisión de un fluoróforo es lo suficientemente pequeña para que no haya diferencias significativas entre las propiedades ópticas.

De esta manera, (1.38) se reduce a:

$$\begin{aligned} -\nabla \cdot D(r) \nabla U_{ex}(r) + \mu_a(r) U_{ex}(r) &= q_0(r_s) \\ -\nabla \cdot D(r) \nabla U_{fl}(r) + \mu_a(r) U_{fl}(r) &= F(r) U_{ex}(r) \end{aligned} \quad (1.39)$$

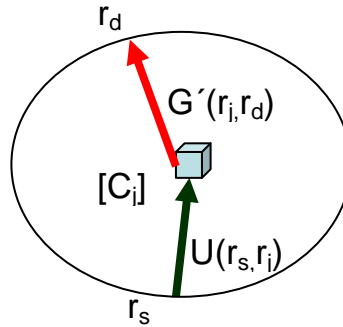
Valiéndose de la función de Green (ecuación 1.18), se obtiene la formulación de Born (figura 2.5) del problema tomográfico [10] :

$$U_{fl}(r_s, r_d) = \frac{1}{4\pi D} \int d^3r F(r) U_{ex}(r_s, r) G(r, r_d) \quad (1.40)$$

Donde  $r_d$  es la posición de la superficie del medio difusivo en la que se encuentra un detector.

Si se discretiza el medio en  $N$  vóxeles cuadrados de arista  $h$ , la integral de la ecuación (1.40) se puede aproximar por:

$$U_{fl}(r_s, r_d) = \frac{1}{4\pi D} \sum_{j=1}^N U_{ex}(r_s, r_j) F_j G(r_j, r_d) h^3 \quad (1.41)$$



**Figura 2.5.** De acuerdo con la formulación de Born, la contribución de un vóxel (cubo azul) a la medida en el detector situado en  $r_d$ , existiendo una fuente en  $r_s$ , es equivalente al producto de la densidad fotónica que se establece en el vóxel debida a la fuente  $U(r_s, r_j)$  por la concentración de fluoróforo en ese vóxel  $C_j$  y por la densidad fotónica de fluorescencia  $U'(r_j, r_d)$  que llega al detector originada por el fluoróforo en el vóxel  $r_d$ .

<sup>\*</sup> Suponemos que el fluoróforo es un sistema cuántico de dos niveles. Por simplicidad hemos omitido deliberadamente que en 1.38 la concentración de fluoróforo debe ir multiplicada por su rendimiento cuántico y su sección eficaz de absorción, ya que son constantes que sólo varían de un tipo de fluoróforo a otro y en este trabajo nos centramos en experimentos en los que participa una sola clase de sonda fluorescente. Esta asunción afecta a la cuantificación absoluta en las reconstrucciones, que debe de ser calibrada para cada clase de fluoróforo, usando un maniquí adecuado.



Si el medio se ilumina secuencialmente con  $l$  fuentes y se dispone de  $n$  detectores, se obtienen  $m = l \times n$  pares detector-fuente y, en base a la ecuación (1.41) llegamos al siguiente sistema de ecuaciones:

$$\begin{pmatrix} U_{fl}^{meas}(r_{s1}, r_{d1}) \\ \vdots \\ U_{fl}^{meas}(r_{sm}, r_{dm}) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} W_{11} & \cdots & W_{1n} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ W_{m1} & \cdots & W_{mn} \end{pmatrix} \bullet \begin{pmatrix} C_1 \\ \vdots \\ C_n \end{pmatrix} \quad (1.42)$$

Donde  $W_{ij} = U(r_{si}, r_j)U'(r_j, r_{di})$  es la matriz de pesos cuyos términos se pueden interpretar como la probabilidad de que para el par detector-fuente  $i$ , el vóxel  $j$  contribuya en una unidad a la medida en el detector. Desde una perspectiva similar, representan la probabilidad de que un fotón inyectado en el medio por la fuente en  $r_{si}$  llegue al vóxel  $j$ , se convierta en un fotón fluorescente al excitar el fluoróforo, y llegue al detector situado en  $r_{di}$ . El superíndice *meas* significa medido (del inglés *measured*). El problema directo consiste en hallar la matriz de pesos, usando el aparatage matemático descrito en la sección 2.1, mientras que el problema inverso consiste en resolver el sistema de ecuaciones (1.42), hallando la distribución tridimensional de la concentración de fluoróforo en el sujeto.

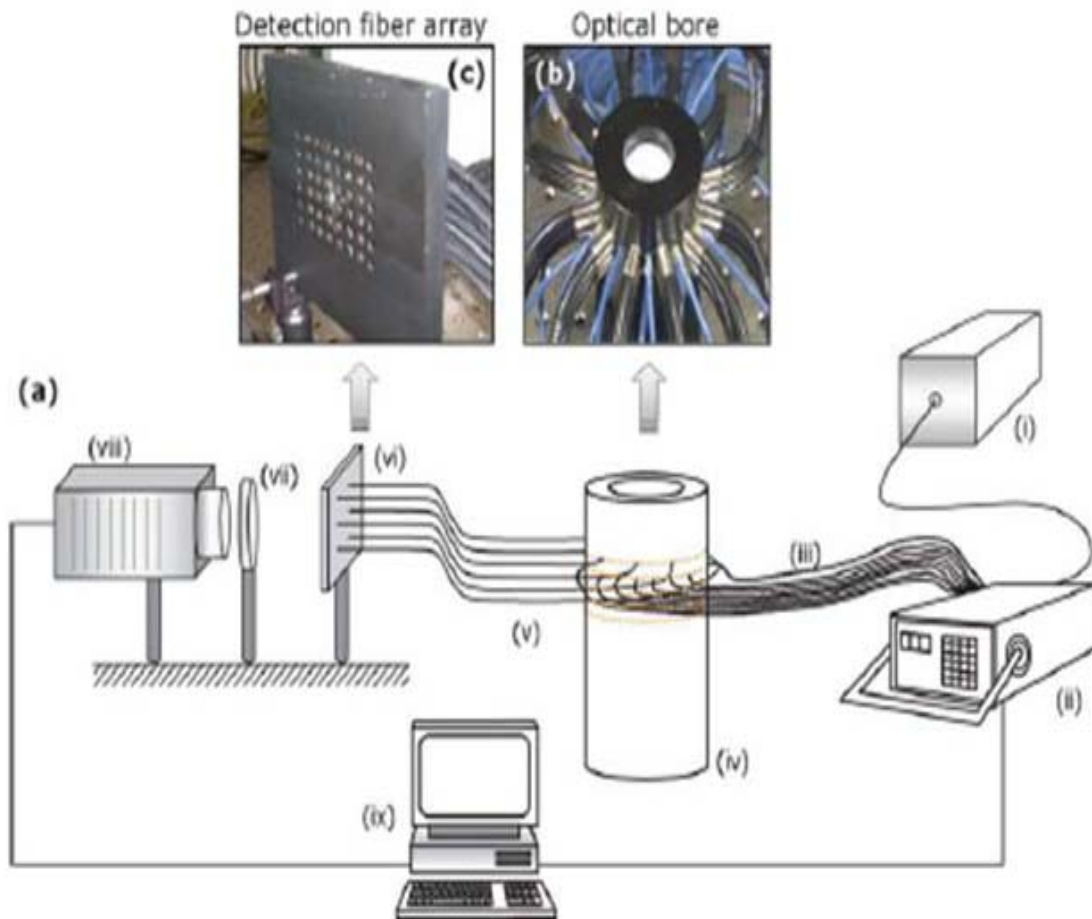
La aproximación más común consiste en medir la densidad fotónica de excitación y la densidad de fluorescencia, usando su cociente como entrada de datos en el sistema de ecuaciones y modificando los pesos en consecuencia. Es lo que algunos autores han dado en llamar aproximación normalizada de Born [26]. Matemáticamente se escribe como:

$$U_{nborn}^{meas}(r_{si}, r_{di}) = \frac{U_{fl}^{meas}(r_{si}, r_{di})}{U_{exc}^{meas}(r_{si}, r_{di})} = \frac{1}{4\pi D} \frac{\sum_{j=1}^N U_{ex}(r_{si}, r_j) F_j G(r_j, r_{di}) h^3}{U_{ex}(r_{si}, r_{di})} \quad (1.43)$$

Este planteamiento ha supuesto un paso decisivo en el desarrollo tecnológico de la FDOT, ya que permite que la calidad de las reconstrucciones tengan un alto grado de insensibilidad a los errores de modelado [61-62], permitiendo modelar el viaje fotónico a través los sujetos bajo estudio asumiendo que tienen parámetros ópticos homogéneos. En esta tesis se ha estudiado en profundidad el grado de exactitud de esta aproximación. Los resultados se muestran en el Capítulo 4.

## 2.2 Estado de la técnica, sistemas FDOT

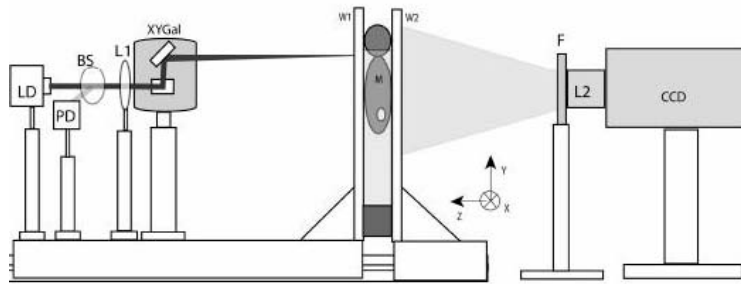
Los primeros prototipos de FDOT aplicados a animales pequeños se basaron en la llamada “geometría de contacto”. Bajo este planteamiento, la luz proveniente del láser se guía hasta el sujeto mediante fibras ópticas (fibras fuente). Igualmente, la luz emitida por el sujeto se lleva hasta una cámara CCD (del inglés *charge coupled device*) por fibras (fibras detectores). Situando los filtros paso banda adecuados frente a la óptica de la cámara, se miden separadamente la densidad fotónica de excitación y de fluorescencia. Un interruptor óptico, permite seleccionar la fibra por la que llega la radiación al sujeto. De esta manera, se consiguen  $n_s \times n_d$  pares detector fuente. El montaje presentado en [63] (*figura 2.6*) es considerado el primer FDOT aplicado a animales pequeños. El animal bajo estudio se introduce en un receptáculo cilíndrico que se rellena con fluido de propiedades ópticas equivalentes a las del sujeto. Este tipo de fluidos se fabrican a partir de emulsiones lipídicas comerciales (Intralipid), que simulan la dispersión, y tintas que simulan la absorción en las concentraciones adecuadas [64].



**Figura 2.6.** Esquema de un FDOT en geometría de contacto. i) Fuente láser. ii) Interruptor óptico. iii) Fibras ópticas fuente. iv) Habitación cilíndrica. v) Fibras detectores. vi) Pantalla plana. vii) Filtro óptico. viii) Cámara CCD. ix) Ordenador. [63]

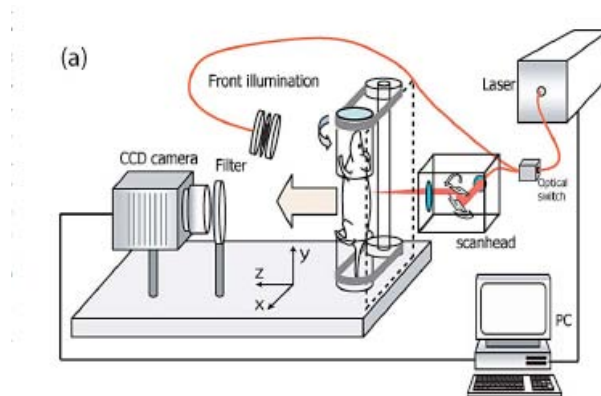
La gran desventaja de este tipo de sistemas es que el número de pares detectores fuente está fuertemente limitado, y no alcanza el número deseable. Usando la técnica de análisis de valores singulares (ver apéndice 3), se ha demostrado [57] que la densidad de fibras fuentes óptima en la superficie del objeto sobre el que se realiza la adquisición de datos es de  $l$  [detectores/mm<sup>2</sup>], siendo  $l$  el recorrido libre medio de transporte de un fotón. Para las fibras detectores se obtiene el mismo resultado.

En prototipos posteriores, el receptáculo cilíndrico se sustituye por uno cúbico, en el cual se introduce el animal junto con los fluidos, entre dos placas antirreflectantes, situadas paralelamente al detector CCD (figura 2.7). Este tipo de geometría se conoce como geometría de placas paralelas [57, 65] y permite evitar tener que usar fibras ópticas para la detección, muestrándose la densidad óptica en la superficie del sujeto directamente a partir de los píxeles de la cámara. Esta clase de sistemas permite además el guiado de la luz láser de excitación mediante espejos, permitiendo aumentar el número de fuentes hasta llegar a la densidad suficiente [57].



**Figura 2.7.** Esquema de un FDOT de placas paralelas. La luz láser generada por un diodo (LD), es guiada por dos espejos movidos por galvanómetros (XYGal) hasta el sujeto M, situado en una receptáculo con placas paralelas W1, W2. Para cada posición de la fuente se obtienen las imágenes de excitación y fluorescencia, utilizando el filtro adecuado F, frente a la óptica del detector L2. Estas imágenes se muestrean vía software, definiendo los detectores deseados en W2 [65].

La siguiente evolución reseñable de los sistemas FDOT se produjo con la publicación de [66-67], en la cual se estableció el formalismo matemático necesario para inferir la densidad fotónica difusiva en la superficie del sujeto a partir de detectores CCD situado en geometría de no contacto y con cualquier ángulo respecto a la normal. Este hito ha dado paso a la aparición de los primeros FDOT que no precisan de fluido de propiedades ópticas equivalentes [41], permitiendo que el sujeto gire sobre si mismo [68] adquiriendo varias proyecciones geométricas (figura 2.8). En otros sistemas se ha optado por que el detector gire en torno al animal [69], de esta manera el sujeto permanece inmóvil y se evitan los posibles artefactos derivados del movimiento.



**Figura 2.8.** Esquema de un FDOT de no contacto en el que el sujeto gira 360°, permitiendo obtener pares detector-fuente correspondientes a diferentes proyecciones angulares. [42]

Reciente se han desarrollado las primeras maquinas híbridas FDOT/CT, y FDOT/MRI [27-29, 70-71]. Este tipo de sistemas son muy útiles, ya que tanto el CT, como la MRI proporcionan imágenes anatómicas, facilitando la interpretación de las reconstrucciones FDOT. Además, esta información puede ser utilizada como “a priori” en el algoritmo de reconstrucción, tanto para la mejora del problema directo como del inverso [70, 72] (ver Apéndice 3).

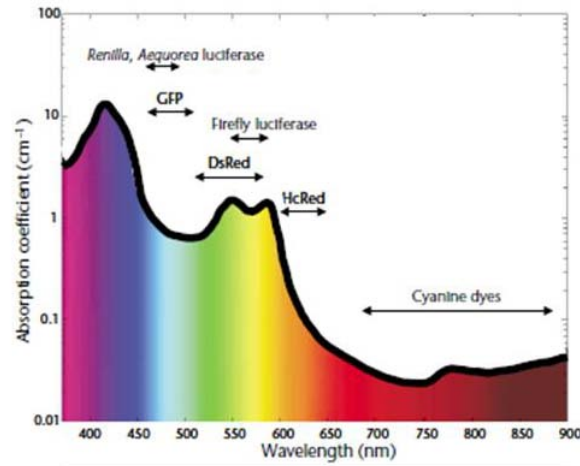
## 2.3 Factores intrínsecos de emborronamiento en las reconstrucciones

Hay diversos factores que operan activamente en contra de la calidad y fiabilidad de las reconstrucciones de tomografía óptica como el condicionamiento del sistema de ecuaciones, la longitud de onda, la profundidad, las situación de objetos múltiples o la autofluorescencia.

El mal condicionamiento (del inglés “ill-conditioned”) [73-76] del sistema de ecuaciones es consecuencia de la gran disparidad existente entre el autovalor mayor y el menor de la matriz de pesos. Al existir autovalores muy cercanos a cero, pequeños cambios en los datos conllevan cambios drásticos en la reconstrucción. Esta situación, que es común a la de muchos otros problemas inversos en imagen médica, afecta negativamente a la estabilidad, unicidad y existencia de las soluciones de la ecuación (1.43), siendo necesarias técnicas de regularización [77] (ver Apéndice 2).

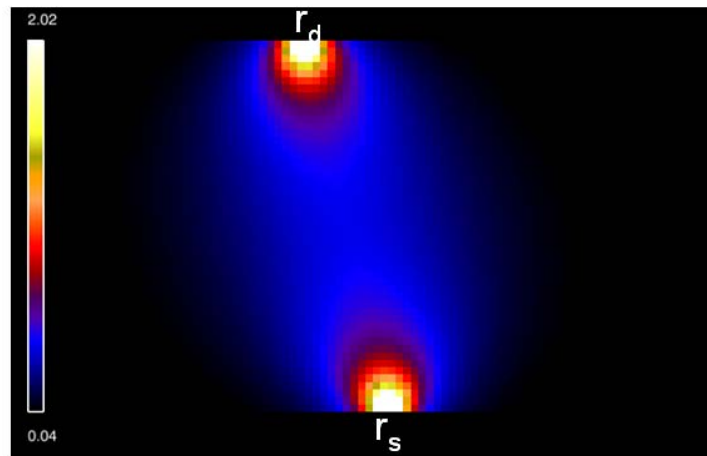
La longitud de onda de excitación y fluorescencia es también relevante, pues va a determinar la profundidad de detección del sistema. En todo el espectro visible, la absorción es muy alta, restringiendo la capacidad de profundización a 2-3 mm, debido fundamentalmente a la hemoglobina de la sangre, que es un absorbente muy eficaz. En cambio, en la zona del infrarrojo cercano (670-900nm), el coeficiente de absorción cae drásticamente (figura 2.9), pudiéndose

encontrar en la literatura longitudes de penetración de hasta 17 cm [5-6, 78], haciendo de la FDOT una técnica especialmente útil para la adquisición de imagen en animales pequeños.



**Figura 2.9.** Coeficiente de absorción en función de la longitud de onda para tejidos biológicos. Esta gráfica está calculada para una saturación de oxígeno del 70% con una concentración de 50 mM de hemoglobina, 50 % agua y 15% lípidos. En la parte superior se muestran algunas de las sondas fluorescentes más relevantes en función de las longitudes de ondas con las que interactúan.[6]

La profundidad es un factor que influye determinantemente en la resolución [17, 69]. Para cada par detector fuente, cerca de la superficie del sujeto, la probabilidad de que cada vóxel contribuya a la medición en el detector es alta en una zona estrecha, mientras que conforme la profundidad aumenta, la zona con vóxeles de alta probabilidad de contribución se ensancha, obteniéndose la característica “banana shape” (figura 2.10).

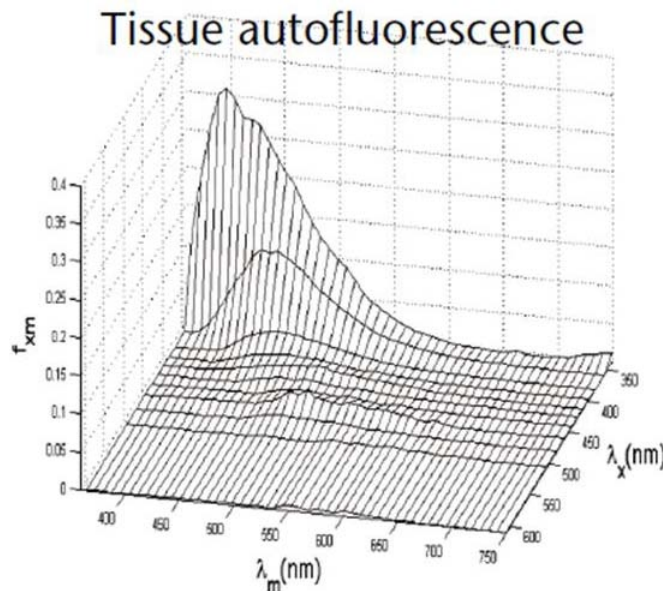


**Figura 2.10** Representación gráfica de los pesos de cada vóxel, para una fuentes situada en  $r_s$  y un detector situado en  $r_d$ .

Este hecho hace que la resolución empeore notablemente conforme aumenta la profundidad. Para paliar este efecto se ha propuesto en [79] plantear un esquema de regularización dependiente de la profundidad. El límite de la resolución viene determinado también por el modelo matemático, siendo el recorrido libre medio de transporte el factor limitante [10]

La forma característica de la distribución de probabilidades de la matriz de pesos es consecuencia de la fuerte no linealidad de las soluciones de las ecuaciones del transporte fotónico. Esta particularidad también implica que la calidad de las imágenes reconstruidas empeore notablemente en la situación de hacer imagen de objetos múltiples y provocando la aparente contradicción de que la reconstrucción solo es la convolución de la PSF (del inglés “point spread function”) con la imagen real para el caso de que la imagen esté compuesta por un solo objeto puntual en una posición determinada [17].

Por último es importante señalar la “autofluorescencia”, que es un abuso del lenguaje utilizado para referirse a la fluorescencia endógena de los tejidos biológicos. Su presencia empeora las reconstrucciones al contaminar la señal de interés. Se han planteado algoritmos que tratan de sustraerla de los datos adquiridos [80]. La autofluorescencia es muy alta para longitudes de onda en el visible, y decae fuertemente en la zona NIR [6] (*figura 2.11*).



**Figura 2.11.** Espectro de la autofluorescencia, en función de la longitud de onda de excitación  $m$  y la de emisión  $x$ . Este grafica fue obtenida iluminando un ratón a la diferentes longitudes de onda en la parte anterior de su caja torácica, usando láseres colimados, y midiendo la intensidad de luz transmitida en la parte anterior, usando diferentes juegos de filtros. [6]

## Capítulo 3

*En este capítulo se describen los detalles del diseño, construcción y evaluación del sistema FDOT en geometría de placas paralelas que se ha desarrollado. Hemos estudiado la calidad de las reconstrucciones en función de los parámetros del algoritmo ART. Este prototipo nos ha servido como base para realizar los estudios presentados en los capítulos 4 y 5, que han contribuido a mejorar la comprensión y prestaciones de la técnica.*

### 3. Diseño y construcción de un sistema FDOT

#### 3.1 Introducción

Está probado que la FDOT en geometría de placas paralelas tiene una resolución, capacidad de profundización y sensibilidad suficientes para detectar y reconstruir la distribución tridimensional de cantidades biológicamente relevantes de fluoróforos en ratones [57, 65]. Otras configuraciones en rotación han demostrado un mejor rendimiento en experimentos con maniqués homogéneos [34], sin embargo la complejidad de estos sistemas es mucho mayor. En el capítulo 5 de este documento nos ocupamos de este asunto, realizando una comparativa novedosa, que hace énfasis por primera vez en el hecho de que en la geometría de placas paralelas, el sujeto se comprime ligeramente, mejorando el planteamiento matemático del problema y siendo equiparable a la configuración en rotación.

Hasta la fecha se han propuesto tres sistemas FDOT que se basan en la geometría de placas paralelas para obtener imágenes de animales pequeños. En el propuesto en [57], la luz llega al sujeto desde el emisor láser mediante fibras ópticas. Los propuestos en [35, 65] no usan fibras. En los sistemas descritos en [57] y [65] introducen al sujeto sobre el que se va a hacer imagen en un tanque con fluido de propiedades ópticas equivalentes a las del tejido biológico. Esto añade atenuación y dispersión a los fotones que llegan al detector, redundando en un empeoramiento de las reconstrucciones. El sistema propuesto en [35] no utiliza este tipo de fluidos y es capaz de

realizar mediciones tanto en reflexión como en transmisión, sin embargo está optimizado para obtener imágenes de proteínas fluorescentes.

En estos trabajos, el problema inverso se resuelve utilizando el algoritmo ART, método de reconstrucción común para los sistemas FDOT. Este reconstructor es iterativo y hay dos factores principales que rigen su funcionamiento: el parámetro de la relajación y el número de iteraciones [81-83]. Su influencia en la calidad de la reconstrucción tomográfica es de gran importancia y ha sido estudiada para otras técnicas tomográficas como el SPECT [83]. A mayor parámetro de relajación, mejor resolución pero por el contrario más ruido y viceversa [84]. El número de iteraciones se comporta de manera análoga, a mayor número de iteraciones mejor resolución pero más ruido.

En el caso de los sistemas de DOT se han propuesto varias modificaciones del algoritmo, en relación con el acceso de proyección [85] y constricciones espectrales [86].

Tomando como base la literatura previa expuesta en esta introducción, hemos construido un FDOT en geometría de placas paralelas, que no usa fluidos de propiedades ópticas compatibles y que permite realizar imagen sobre animales pequeños usando fluoróforos que operan en la ventana espectral del infrarrojo cercano. Hemos caracterizado el tomógrafo calculando la resolución y nivel de ruido de las reconstrucciones, en función del parámetro de la relajación y el número de iteraciones del algoritmo ART. También hemos caracterizado la capacidad de cuantificación de la máquina, usando varios maniquís con fluoróforos a diferentes concentraciones conocidas. Los valores obtenidos se han comparado con los presentes en la literatura para sistemas análogos [35, 57, 65].

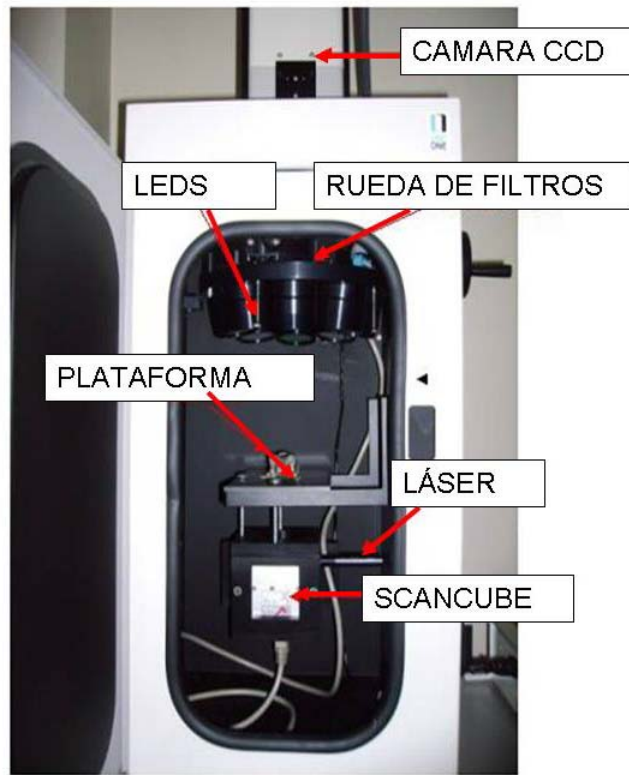
La capacidad del sistema para hacer imagen en roedores pequeños se probó haciendo imagen ex-vivo sobre un ratón, al que se insertó un capilar lleno de fluoróforo en el esófago.

## **3.2 Material y Métodos**

### **3.2.1 Descripción del sistema FDOT**

El sistema FDOT que se ha construido tiene las siguientes características: el sujeto sobre el que se va a hacer la adquisición se coloca en una cama especialmente diseñada, levemente comprimido entre dos placas planas antirreflectantes, asegurando fronteras planas. La cama se inserta en una plataforma fija a una distancia conocida de la cámara CCD (ORCA II, Hamamatsu, Japón) y el objetivo (Nikon), las placas anti-reflectantes quedan situadas en paralelo con el chip CCD de la cámara. El láser se dirige hacia la muestra mediante dos espejos movidos mediante galvanómetros, (Scancube 7, AG Scanlab, Alemania) tal y como se muestra en la *figura 3.1*.





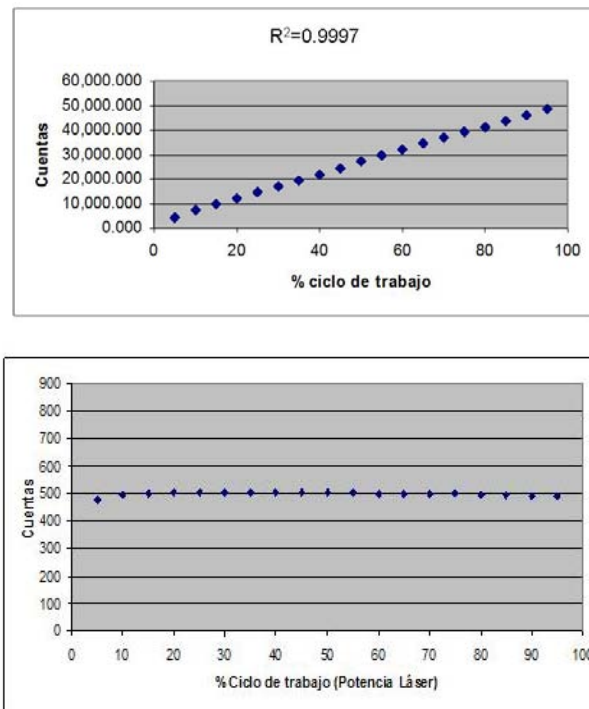
**Figura 3.1.** Fotografía del sistema de FDOT. El haz láser se introduce en el Scancube, dentro del cual dos espejos movidos por galvanómetros lo dirigen hacia la plataforma donde se encuentra la muestra. Mediante una rueda motorizada se cambian los filtros frente al objetivo de la cámara CCD, para tomar las imágenes de excitación y de fluorescencia.



**Figura 3.2.** Fotografía de la cama donde se introduce la muestra, levemente comprimida entre dos cristales antirreflectantes. La cama se inserta manualmente en la plataforma, quedando fija.

La radiación láser la genera un sistema basado en un diodo emisor (Monocrom, Barcelona, España) a una longitud de onda de  $675 \pm 5$  nm. La potencia entregada se controla mediante una señal TTL (período 500  $\mu$ s), modulando el ciclo de trabajo de la señal se varía la potencia del láser.

El tiempo de exposición de la cámara se mantiene constante (2 s para la medición de fluorescencia y 0,035 s para las mediciones de excitación). Para cada fuente, se varía la potencia del láser automáticamente hasta alcanzar aquella que maximiza el número de cuentas en la CCD sin llegar a producir efectos de saturación. Los valores típicos de potencia se encuentran en el rango de 1 mW para la medición de fluorescencia y de 0.005 mW para las mediciones de excitación. Todas las imágenes adquiridas se normalizan por la potencia del láser. Previo a la normalización de las imágenes es necesario sustraer la imagen de ruido de fondo, que se obtiene simplemente realizando una adquisición con el láser apagado (*figura 3.3*).



**Figura 3.3. Arriba:** Valor de las cuentas en la cámara en función de la variación de la señal TTL del láser. Para evitar la saturación de los píxeles, el láser no se hace incidir directamente en la óptica del objetivo, si no que se dirige hacia una superficie de papel. Las cuentas de la cámara se calculan como el valor medio de los píxeles de las imágenes obtenidas. **Abajo:** Valor medio de las imágenes adquiridas a las que se ha restado la imagen de ruido de fondo y se ha normalizado por la potencia del láser.

Para obtener la señal de fluorescencia se coloca frente al objetivo de la cámara un filtro óptico cuyo ancho de banda es 10 nm y que está centrado en 720 nm. Para obtener las imágenes de excitación se utiliza un filtro centrado 675 nm de también 10 nm de ancho de banda. Los filtros se colocan frente a la cámara usando una rueda de filtros motorizada (Luxiflux V2, Cyberstar, Echirolles, Francia). El proceso de adquisición se controla mediante un programa de adquisición integrado en el interfaz de usuario del sistema (vez Apéndice 5).

### 3.2.3 El problema inverso, algoritmo de reconstrucción ART

El problema directo se plantea usando aproximación normalizada de Born (ecuación 1.43). Debido a las fronteras planas, la matriz de pesos se calculó usando el método de las imágenes (ecuación 1.32).

El algoritmo ART obtiene la solución del sistema de ecuaciones tomográfico siguiendo los siguientes pasos: Una estimación inicial imagen reconstruida se proyecta sobre el hiperplano definido por las componentes del vector que se construye a partir de los elementos de una fila de la matriz del sistema de ecuaciones lineales. Esta proyección se utiliza como la estimación siguiente de la solución y se proyecta sobre el hiperplano definido por otra fila del sistema lineal. El proceso se realiza iterativamente hasta que la imagen reconstruida sea satisfactoria.

Escribiendo la ecuación (1.43) como  $b=Wx$ , ART tiene la forma [81]

$$x_j^k = x_j^{k-1} + \alpha \left[ (b_i - \sum_j w_{ij} x_j^k) / \sum_{i=1}^N w_{ij} \right] \quad (2.1)$$

En esta expresión  $x_j^k$  es la estimación k-ésima del vóxel  $j$ ,  $b_i$  es el dato medido obtenido para la pareja fuente-detector detector  $i$ , y  $w_{ij}$  es el elemento  $ij$  de la matriz de pesos y  $\alpha$  es el parámetro de relajación.

Consideraremos que una iteración del algoritmo ART se ha completado cuando la reconstrucción estimada se ha proyectado sobre cada fila de la matriz de pesos.

### 3.2.4 Caracterización de la resolución y el ruido.

Para caracterizar el aparato nos hemos basado en los artículos de referencia [65] y [17], ya que debido a la juventud de la técnica FDOT, no existen estándares internacionales para evaluar sistemas particulares.

El método planteado consiste en la construcción de un maniquí con propiedades ópticas homogéneas, en el que se inserta una distribución puntual de fluoróforos. Sobre éste se realiza una adquisición para posteriormente obtener reconstrucciones con diferentes valores del

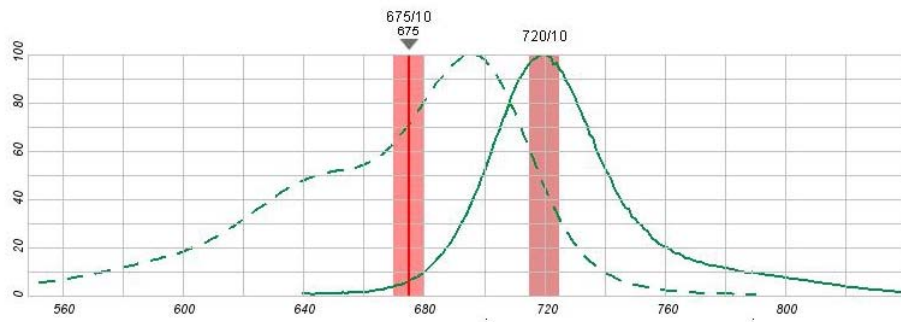
coeficiente de relajación y el número de iteraciones. A partir de estas reconstrucciones se evalúan la resolución y el ruido de la imágenes usando las métricas que propuestas en [17] y [83] que se detallan en la sección 3.2.4.2.

Para medir la capacidad de cuantificación se realizaron cinco adquisiciones sobre el mismo maniquí y con la misma distribución de fluoróforo variando la concentración para cada adquisición, tal y como se detalla en la sección 3.2.5. Conocidas las concentraciones, la cuantificación se caracteriza realizando una regresión lineal entre las concentraciones obtenidas en las reconstrucciones FDOT y las concentraciones reales. Se usaron como parámetros de relajación y número de iteraciones los encontrados como óptimos en el estudio de caracterización de la resolución y el ruido

### 3.2.4.1 Diseño del maniquí y parámetros de adquisición

Se ha construido un maniquí tipo “ladrillo” basado en resina de poliéster [13]. Este material se adquiere de la casa comercial en estado líquido y tras añadir la cantidad adecuada de catalizador solidifica. La absorción y la dispersión que presenta son depreciables. Durante el proceso de curado se añade tinta negra (Rotring) y TiO<sub>2</sub> (Sigma Aldrich), en las proporciones adecuadas para obtener los coeficientes de absorción y dispersión deseados. Para la caracterización se eligió  $\mu_a = 0.3 \text{ cm}^{-1}$  y  $\mu'_s = 10 \text{ cm}^{-1}$  [21-22] [13, 64]; estos valores se corresponden con los valores medios de un ratón estimados en la literatura [62].

El tamaño del paralelepípedo se escogió de 8x6x1.5cm. En la punta del capilar se introdujeron 6  $\mu\text{l}$  del fluoróforo Alexa Fluor 720 (figura 3.6) (Invitrogen, Carlsbad, California) a una concentración de 20  $\mu\text{M}$ .

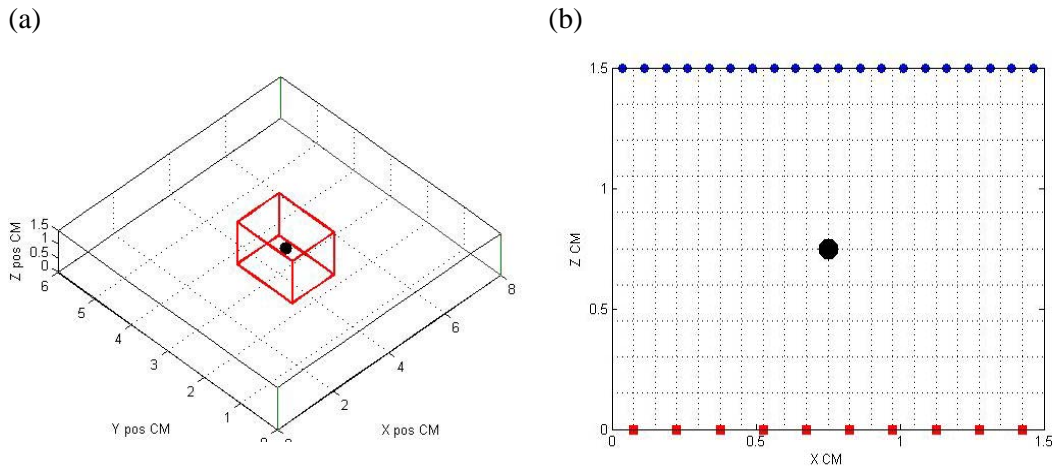


**Figura 3.6.** Espectro de absorción (línea discontinua) y de emisión (línea continua) del Alexa FLuor 720. Se observan los filtros de absorción (rojo claro) y de emisión (rojo oscuro) además de la posición del láser de excitación (línea roja) (Life Technologies Corporation, USA)

Se practicó un agujero en el maniquí, de manera que, una vez insertado el capilar, su extremo se posicionase en el centro geométrico del ladrillo. Esta colocación no es casual dado que la resolución de un sistema FDOT empeora notablemente con la profundidad, por lo tanto colocar el objeto en el centro geométrico del maniquí, asegura que se está midiendo la peor resolución posible.

El diámetro interno del capilar es de 1 mm, que corresponde al recorrido libre medio de transporte fotónico, lo cual asegura el carácter puntual de la distribución de fluoróforo utilizada (ver *sección 2.3*).

Para realizar la reconstrucción, se computó la matriz de pesos correspondiente a un mallado de 20x20x10 vóxeles, ocupando un campo de visión de 1.5x1.5x1.5 cm cuyo centro coincide con el centro geométrico del maniquí. La excitación se realizó definiendo 10x10 fuentes equidistantes sobre el cuadrado conformado por la “tapa” inferior del cubo donde se define el mallado, mientras que para la detección se seleccionaron 12x12 detectores equiespaciados sobre el cuadrado conformado por la “tapa” superior del mallado (*figura 3.7*).

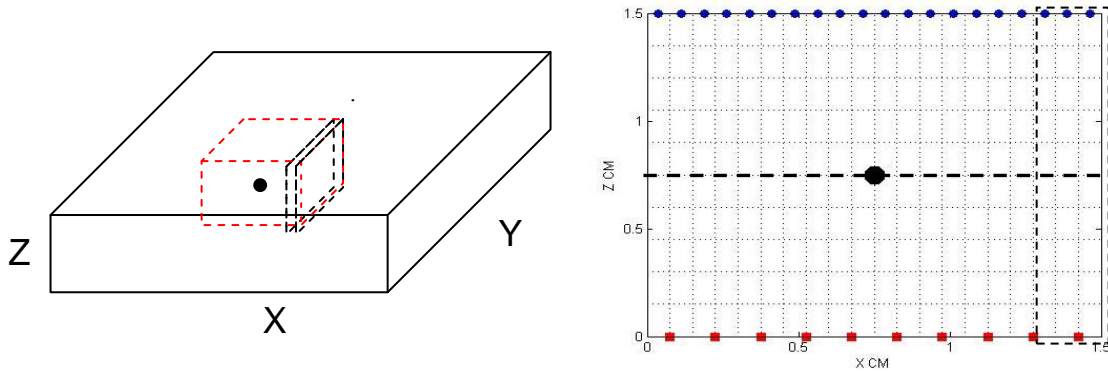


**Figura 3.7.** **a)** Configuración geométrica del ladrillo (negro) y la malla de reconstrucción (en rojo). El punto negro representa la punta del capilar. **b)** Configuración geométrica de fuentes (rojo) y los detectores (azul) en la rodaja correspondiente al plano  $y=0.75$  cm. Nuevamente en negro aparece la punta del capilar. Las líneas punteadas definen los vóxeles.

### 3.2.4.2 Resolución y ruido

Como métrica de la resolución del sistema se usó el FWHM (del inglés “full width at half maximum”) de la PSF (del inglés “point spread function”) de la imagen del punto fluorescente [17, 65], que se obtuvo a partir de un perfil en la dirección  $X$  del plano  $Y=0.75$  que cruza el FOV

(del inglés “field of view”) de la malla a media altura, es decir  $Z=0.75$  (figura 3.8). Como medida del contenido de ruido de las imágenes reconstruidas se utilizó el coeficiente de variación del fondo (CV), definido por la expresión  $CV=(\sigma/B)\times 100$  donde  $B$  y  $\sigma$  son la media y la desviación estándar del fondo [83], tomado como el volumen representado en la figura 3.8. Al escoger esta región se asegura que ningún vóxel correspondiente al objeto reconstruido se incluye en la medición del fondo.



**Figura 3.8.** **.Izquierda.** Representación del maniquí (caja negra grande) y el FOV del mallado (caja roja). El área seleccionada para medir la variación del fondo está representada por el paralelepípedo de línea discontinua. **Derecha.** Representación sobre el plano  $y=0.75$  cm del mallado sobre el que se traza el perfil utilizado para medir la PSF (línea discontinua) y el rectángulo sobre el que se calcula la variación del fondo. El punto negro representa el fluoróforo.

### 3.2.4.3 Numero de iteraciones y parámetros de relajación

Se ha medido la resolución y el ruido usando 10 parámetros de relajación: 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.7, 1, y 1.5. Para cada uno de ellos se varió el número de iteraciones de 1 hasta 100. Estos rangos de valores incluyen todos los observados en la literatura [35, 37, 57, 69]. En total se generaron 900 reconstrucciones con sus correspondientes medidas de resolución y ruido.

### 3.2.5 Caracterización de la precisión de la cuantificación.

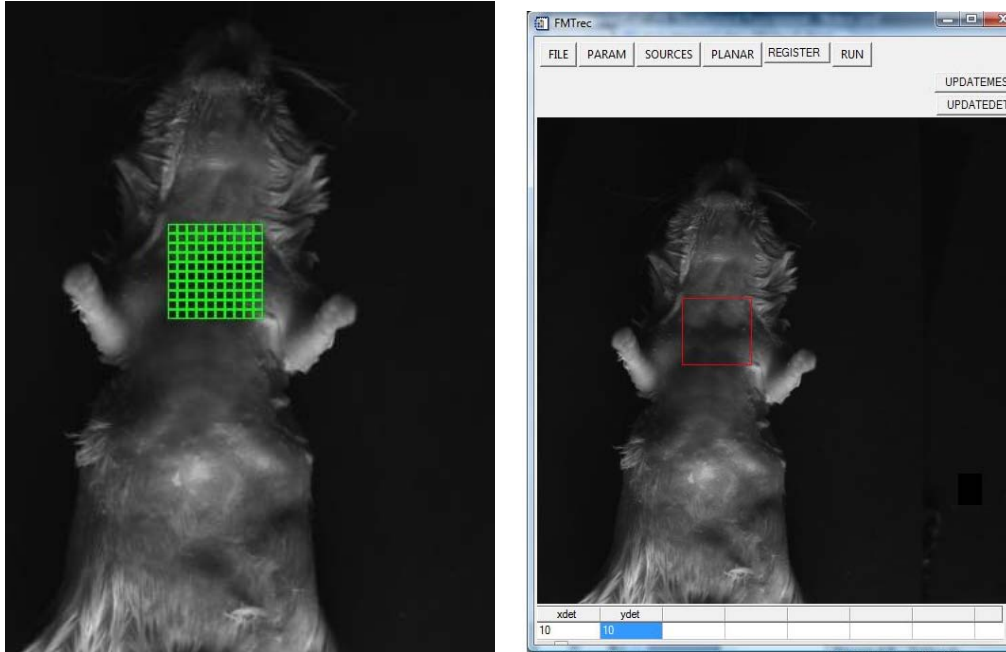
La capacidad de cuantificación se caracterizó realizando adquisiciones sobre un maniquí con la misma geometría y distribución de fluoróforo que la presentada en la sección 3.2.4.1, en cada una de las cuales el capilar se relleno con las siguientes concentraciones de fluoróforo: [1.38, 1.71, 2.04, 2.37, 2.70]\* $10^4$  nM. Para computar las reconstrucciones se usó el algoritmo ART con los parámetros que proporcionan una resolución adecuada para este tipo de sistemas según nuestro

estudio (*sección 3.4.1*). La cuantificación se realizó cogiendo el valor medio de la imagen obtenido tras enmascarar los vóxeles cuyo valor fuera menor que el 50% del valor máximo. Este método evita los posibles sesgos que se introducen al cuantificar escogiendo una ROI (del inglés “región of interest”) manualmente y calculando la media de los valores de los vóxeles contenidos en ella.

Se hizo ajuste lineal entre los valores de concentración FDOT y los valores reales tomándose la bondad de la aproximación  $R^2$ , como una estimación de la capacidad de cuantificación [65].

### 3.2.6 Imagen de ratón.

Para demostrar la capacidad del tomógrafo para realizar imagen con animales, se introdujo un capilar de 1.5 mm de diámetro, cuya punta se rellenó con 6  $\mu$ l Alexa Fluor 720, en el esófago de un ratón adulto que previamente había sido sacrificado. Para realizar el experimento se eligió una malla de fuentes de 10x10, con un espaciado de 1 mm, escaneándose la región torácica del sujeto. La reconstrucción se realizó seleccionando un mallado de 20x20x10 puntos sobre un cubo de dimensiones 1.5x1.5x1 cm (*figura 3.9*), escogiendo en la parte superior 10x10 detectores con 1 mm de espaciado

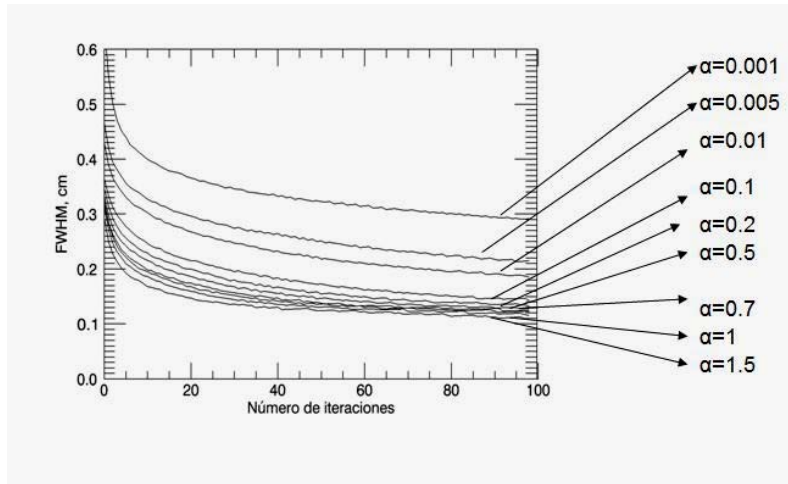


**Figura 3.9.** **Izquierda:** Sobre la imagen de luz de blanca de referencia se sobre impone la posición de la fuentes (cuadrados verde). La luz incide en el ratón en la parte posterior. **Derecha:** Sobre la imagen de luz de blanca de referencia se muestra la zona elegida para hacer la reconstrucción (cuadrado rojo)

### 3.3. Resultados

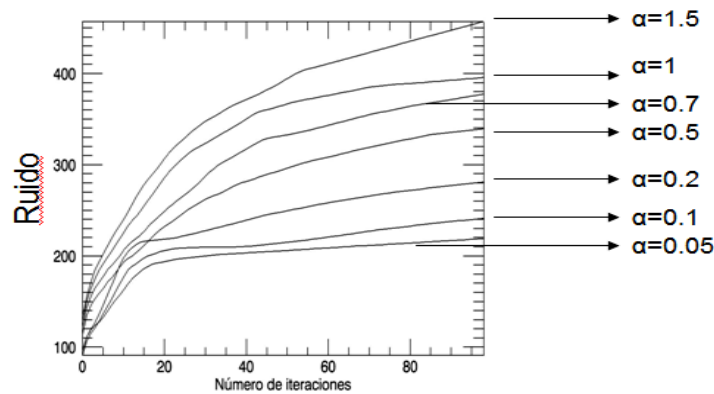
#### 3.3.1 Caracterización de la resolución y el ruido

La gráfica de *figura 3.10* muestra los diferentes valores obtenidos de resolución en función del número de iteraciones y el parámetro de relajación. Cuando estos aumentan, la resolución mejora.



**Figura 3.10.** Curvas que representan la resolución en función del número de iteraciones para cada valor del parámetro de relajación  $\alpha$ .

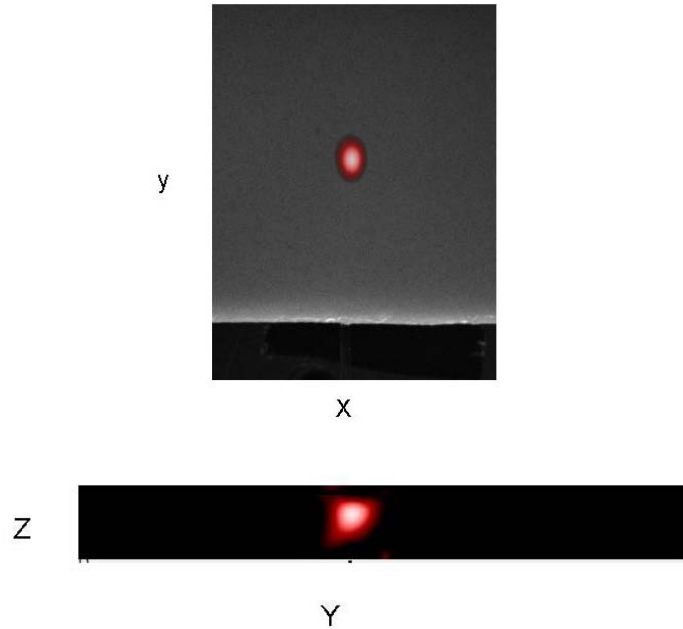
En la *figura 3.11* se muestra la evolución del ruido en función los parámetros de ART. El comportamiento es opuesto al de la resolución, empeorando conforme la relajación y las iteraciones aumentan.



**Figura 3.11.** Curvas que representan el ruido medido frente al número de iteraciones para cada valor del parámetro de relajación  $\alpha$ .



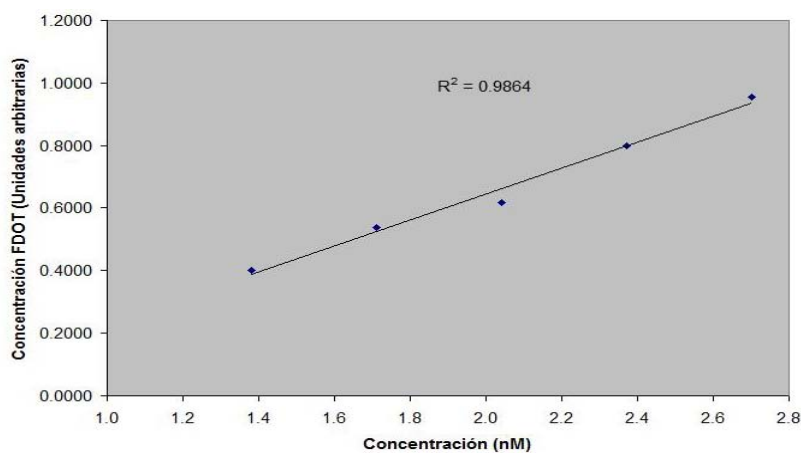
En la *figura 3.12* se muestra la reconstrucción del capilar insertado en el maniquí, realizada usando los parámetros  $\alpha=1.5$  y 80 iteraciones. La distribución tridimensional de los fluoróforos es perfectamente distinguible.



**Figura 3.12. Arriba:** Corte coronal de la reconstrucción FDOT (escala de color) correspondiente al plano  $Z=0.75$  cm, sobreimpuesta a la imagen de luz blanca. **Abajo:** Corte sagital de la reconstrucción FDOT correspondiente al plano  $X=0.75$  cm.

### 3.3.2 Caracterización de la capacidad de cuantificación.

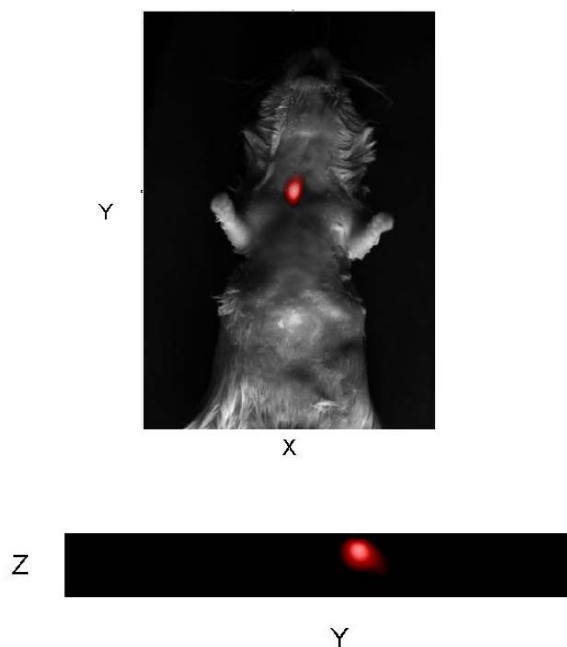
En la *figura 3.13* se muestra la gráfica de cuantificación. Hay una clara linealidad entre los valores reconstruidos de FDOT y la concentración real de fluoróforo. La bondad de la aproximación es  $R^2=0.986$ .



**Figura 3.13.** En esta gráfica se representa los valores obtenidos en la reconstrucción FDOT en función de los valores reales de concentración.

### 3.3.3 Reconstrucción de ratón

La reconstrucción del experimento con ratón se muestra en la *figura 3.14*. La distribución tridimensional de los fluoróforos es perfectamente discernible. Se usaron 80 iteraciones con  $\alpha=1.5$ .



**Figura 3.14. Arriba:** Corte coronal de la reconstrucción FDOT (escala de color) correspondiente al plano  $Z=0.30$  cm, sobre impuesta a la imagen de luz blanca. **Abajo:** Corte sagital de la reconstrucción FDOT correspondiente al plano  $X=0.50$  cm.

### 3.4. Discusión

#### 3.4.1 Valores óptimos de relajación y número de iteraciones

Un simple análisis de las curvas de las *figura 3.10* y *3.11* permite, fijando un valor de resolución concreto, obtener el coeficiente de relajación y el número de iteraciones para las que se obtiene un menor ruido. En la *tabla 3.1* se muestran algunos de estos valores.

**Tabla 3.1.** Valores del parámetro de relajación y numero de iteraciones que minimizan el ruido para un valor de determinado de resolución.

FWHM (Resolución)	Número de iteraciones.	Parámetro de relajación
1.5 mm	80	1.5
1.8 mm	42	0.7
2 mm	45	0.1
2.3 mm	20	0.1

Las duplas de valores de los parámetros de ART mostrados en la *tabla 3.1*, están seleccionados de manera que para diferentes valores de resolución, se minimice el ruido. El proceso se puede realizar a la inversa encontrando los valores que optimicen la resolución dado un determinado nivel de ruido.

Cabe la posibilidad de preguntarse si se puede seleccionar una dupla de parámetros universalmente óptimos. En nuestra opinión, carece de sentido lanzarse a encontrar estos valores, ya que dependiendo del objeto sobre el que se haga imagen, los requerimientos de ruido y resolución serán diferentes. Por ejemplo, para situaciones en las que el fluoróforo se encuentra asentado en tejidos profundos, es necesario usar muchas iteraciones y un parámetro de relajación alto, debido a la dependencia de la resolución con la profundidad. En casos de hacer imagen de fluoróforos situados cerca de la superficie, estas condiciones se pueden relajar, obteniendo imágenes menos ruidosas. Por otra parte, para valores relajación muy bajos, se pueden conseguir resoluciones adecuadas mediante un aumento drástico del número de iteraciones.

### 3.4.2 Caracterización de la resolución, ruido y capacidad de cuantificación

El rendimiento de nuestro equipo en términos de resolución, se puede comparar directamente con el sistema presentado en [65]. En esta publicación se obtiene un FWHM de 2.75 mm para un objeto esférico de 1.6 mm de diámetro, situado a 0.75 cm de la superficie, en un ladrillo de 1.5 cm de altura, mediante 5 iteraciones del algoritmo ART. En nuestro caso usando 5 iteraciones y  $\alpha=1.5$  obtenemos un FWHM de 1.76 mm, para un objeto de 1 mm, siendo el resto de condiciones iguales. El proporción entre el FWHM y la resolución real es de 1.72 para [65] y 1.76 para nuestro prototipo. Usando 80 iteraciones y  $\alpha=1.5$  obtenemos una proporción de 1.5 mm.

La relación entre las curvas PSF presentadas en la *figura 3.10* y la resolución del sistema deben tomarse con precaución ya que tal y como se explica en [17].

*“Diffuse optical tomography is an inherently nonlinear imaging method. Although point spread functions are useful, one cannot be certain that a new object will show up as the original convolved with the PSF”.*

En una situación en la que se pretenda hacer imagen de múltiples objetos, la resolución medida para un solo objeto no se sostiene. En la sección 2.3 se describe más detalladamente esta peculiaridad.

En [57] se presenta una métrica alternativa para la resolución, tomándola como la distancia menor a la que dos distribuciones puntuales son visibles por el sistema. Ambas aproximaciones son validas, siempre y cuando se tenga en cuenta que las medidas no se sostienen al hacer imagen de múltiples objetos.

Con respecto a medida del ruido es importante señalar que se tuvo especial cuidado a la hora de escoger la región incluida en la formula de CV, para medir vóxeles que pertenecían exclusivamente al fondo de la imagen es decir, que no contribuían al objeto reconstruido. Para los valores de  $\alpha$  0.001 y 0.005 CV no se pudo calcular debido a que la PSF cubría todo el FOV de la reconstrucción.

La grafica presentada en la *figura 3.13*, demuestra que el sistema es capaz de cuantificar diferentes concentraciones de fluoróforo. La bondad del ajuste lineal es de  $R=0.98$

### 3.4.3 Imagen de ratón

La reconstrucción del capilar insertado en el esófago del ratón demuestra la capacidad del prototipo para hacer imagen en animales. El tiempo total de adquisición fue de 24 minutos. El

tiempo de escaneo es prácticamente despreciable, ya que el cambio de posición de los espejos del scancube mediante los galvanómetros, se produce en un lapso de tiempo del orden de milisegundos. Por tanto el tiempo que dura un experimento se emplea casi exclusivamente en el tiempo que usa la cámara para adquirir las imágenes correspondientes a cada fuente, y durante el proceso de obtención de la potencia óptima del láser.

### ***3.5 Conclusión***

Hemos diseñado y construido un prototipo de FDOT que funciona en geometría de placas paralelas, incluyendo un software automático de adquisición de fácil uso, así como software de reconstrucción. El sistema ha sido caracterizado y validado frente a máquinas similares presentes en la literatura, obteniendo valores esperables de resolución y capacidad de cuantificación. Hemos demostrado la capacidad del prototipo para hacer imagen en animales pequeños.



## Capítulo 4

*Tal y como se describe en el capítulo 2 y el capítulo 3, numerosos autores plantean el problema tomográfico de FDOT suponiendo propiedades ópticas homogéneas en el sujeto. Sin embargo, se encuentran pocos trabajos en la literatura que recojan la influencia de unas asunciones tan simplistas en la calidad de las imágenes reconstruidas. Por ello, hemos considerado fundamental estudiar los límites de validez de esta aproximación. En este capítulo presentamos los resultados sobre la eficacia de este planteamiento, haciendo énfasis en el efecto del coeficiente de dispersión.*

### 4. Influencia del coeficiente de dispersión en la reconstrucción FDOT usando datos normalizados.

#### 4.1 Introducción

Los algoritmos de reconstrucción de FDOT parten sobre un modelo de la propagación de la luz a través del sujeto bajo estudio. Como hemos descrito en el capítulo 2, este fenómeno se puede tratar mediante la aproximación de difusión de la ecuación de transferencia radiativa, ya que los tejidos biológicos son altamente dispersivos. En este esquema, las propiedades ópticas del medio se describen estadísticamente por el coeficiente de dispersión  $\mu_s$  y de absorción  $\mu_a$ . Mientras que para geometrías sencillas existen soluciones analíticas de esta ecuación, para geometrías más generales y propiedades ópticas heterogéneas es necesario realizar aproximaciones numéricas [7, 60].

Cuando uno se enfrenta al problema del modelado en sujetos vivos, una aproximación realista consiste en suponer que cada tejido posee un coeficiente de dispersión y uno de absorción propios. Una posibilidad es estimarlos usando DOT [87-88], para después hacer FDOT [60], pero esta tarea es complicada: no se puede obtener simultáneamente el coeficiente de absorción y de dispersión con el láser operando en modo de amplitud constante. Otros autores simplemente consideran la variabilidad del coeficiente de dispersión despreciable y estiman los coeficientes de absorción usando DOT. Otra posibilidad es obtener las propiedades ópticas de los tejidos de la literatura [89],

en combinación con la información anatómica de alta resolución proporcionada por un CT o MRI. Sin embargo, no hay acuerdo en la literatura sobre cuáles son los parámetros correspondientes a cada tejido, que además varían de un sujeto a otro [62].

Una aproximación complementaria diferente de las demás se describe en [26]. Bajo esta metodología se asume que las propiedades ópticas son homogéneas, usándose medidas normalizadas en lo que se ha dado en llamar aproximación normalizada de Born (ver sección 2.1.5). Este modo de plantear el problema, que proviene de algoritmos usados previamente para DOT [90], ha permitido la expansión de la técnica FDOT para animales pequeños, debido a que es poco sensible a heterogeneidades de los parámetros ópticos y a su fácil implementación. Sin embargo, muy pocos estudios han explorado los límites de su validez.

Concretamente, se ha demostrado empíricamente que la aproximación es robusta para cuantificar fluoróforos en presencia de heterogeneidades en absorción y pequeñas inclusiones no difusivas [61]. No hay en la literatura ningún estudio sobre el efecto de las heterogeneidades de dispersión en la capacidad de cuantificación de FDOT, cuando se usan datos normalizados y se asumen propiedades ópticas constantes.

Hemos querido estudiar este posible efecto, partiendo de la hipótesis de que en presencia de un coeficiente de dispersión suficientemente heterogéneo, modelizar los parámetros ópticos como homogéneos puede afectar considerablemente la capacidad de cuantificación del sistema a pesar de usar datos normalizados.

Para lograr este objetivo, partimos de un análisis matemático con el que mostramos como, para un medio homogéneo infinito y con geometría ladrillo, las medidas normalizadas en un detector no son invariantes a cambios en los coeficientes de dispersión y de absorción, siendo mayores en el primer caso.

Posteriormente hemos construido un maniquí con propiedades ópticas de fondo homogéneas y una distribución de fluoróforo determinada, en el que se ha practicado una inclusión cilíndrica, de modo similar a como se procede en [61] para las heterogeneidades de absorción. El coeficiente de dispersión en esta región se aumentó dos, tres y cuatro veces con respecto al coeficiente del fondo. Para cada heterogeneidad hemos realizado un experimento FDOT y hemos realizado dos reconstrucciones, una asumiendo propiedades ópticas homogéneas y otra modelando la heterogeneidad, usando la relación normalizada de Born. Las imágenes resultantes fueron comparadas en términos de cuantificación.

Hemos usado el mismo procedimiento, simulando los datos correspondientes a cada maniquí y realizando las reconstrucciones de manera análoga a las del experimento real.



Todo el procedimiento descrito para estudiar la influencia del coeficiente de dispersión (experimentos, simulaciones, reconstrucciones), se ha realizado manteniendo constante  $\mu_s$  y variando  $\mu_a$ . Según [61], en este caso suponer un modelo homogéneo debe inducir a errores de cuantificación pequeños.

Finalmente, en un intento de acercarnos más a la situación experimental real, hemos simulado un experimento en un ratón, en el cual hay dos distribuciones de fluoróforo en dos órganos con diferente coeficiente de dispersión, reconstruyéndolo con el modelo homogéneo y el heterogéneo.

**Tabla 4.1** Coeficiente de absorción, coeficiente de dispersión y el factor de anisotropía  $g$  para diferentes tejidos de humanos [89]

Tejido	$\mu_a(\text{cm}^{-1})$	$\mu_s(\text{cm}^{-1})$	$g$
Aorta	0.52	316	0.96
Músculo	11.2	530	---
Dermis	2.7	187	0.81
Materia blanca	1.58	51.0	0.96
Materia gris	2.63	60.2	0.88
Vejiga	1.40	88.0	0.96
Endocardio	0.07	136	0.973
Epicardio	0.35	167	0.973
Hígado	3.2	414	0.95
Pulmón	8.4	35.9	0.95

## 4.2 Material y Métodos

### 4.2.1 Análisis matemático: Medio infinito y geometría ladrillo.

Imaginemos que situamos un detector en la posición  $r_d$ , en un medio difusivo, con determinados valores de  $\mu'_s$ ,  $\mu_a$  en el que hay una distribución de fluoróforo que se puede considerar puntual e isotrópica, situada en  $r_f$  y una fuente de excitación situada en  $r_s$ , que también consideramos puntual e isotrópica. De acuerdo con la aproximación normalizada de Born (ver sección 2.1.5), la densidad fotónica en el detector será

$$U_{nb}(r_d, r_s, r_f) = \frac{U_{fl}(r_s, r_d)}{U_{exc}(r_s, r_d)} = \frac{1}{4\pi D} \frac{\int d^3r F(r) U_{ex}(r_s, r) G(r, r_d)}{U_{ex}(r_s, r_d)} = \frac{1}{4\pi D} \frac{G(r_d, r_f) G(r_f, r_d)}{G(r_s, r_d)} \quad (3.1)$$

Si el medio es infinito y homogéneo introduciendo la ecuación (1.19) en la ecuación (3.1) y haciendo  $D \approx 1/(3\mu'_s)$  (ver justificación en sección 2.1.2) obtenemos

$$U(r_d, r_s, r_f) = \frac{3\mu'_s}{4\pi} \exp \left[ -\sqrt{3\mu_a\mu'_s} (|r_f - r_s| + |r_d - r_f| - |r_d - r_s|) \right] \frac{|r_d - r_s|}{|r_d - r_f||r_f - r_s|} \quad (3.2)$$

A continuación establecemos  $U(\mu_a, \mu_s)$  como la media en un medio con propiedades ópticas de referencia. Para un medio con coeficiente de absorción de valor  $n\mu_a$  y mismo valor de coeficiente de dispersión, podemos calcular  $\tilde{U}(n\mu_a, \mu_s)$  a partir de la ecuación (3.2). Si la aproximación normalizada de Born fuese totalmente invariante a cambios en el coeficiente de absorción, se debería cumplir,  $\frac{\tilde{U}(n\mu_a, \mu_s)}{U(\mu_a, \mu_s)} = 1$ . Sin embargo

$$\frac{\tilde{U}(n\mu_a, \mu'_s)}{U(\mu_a, \mu'_s)} = \exp \left[ -(\sqrt{n} - 1) \sqrt{3\mu_a\mu'_s} (|r_f - r_s| + |r_d - r_f| - |r_d - r_s|) \right] \quad (3.3)$$

La parte de derecha de la ecuación (3.3) es una exponencial negativa, por lo tanto se cumple que

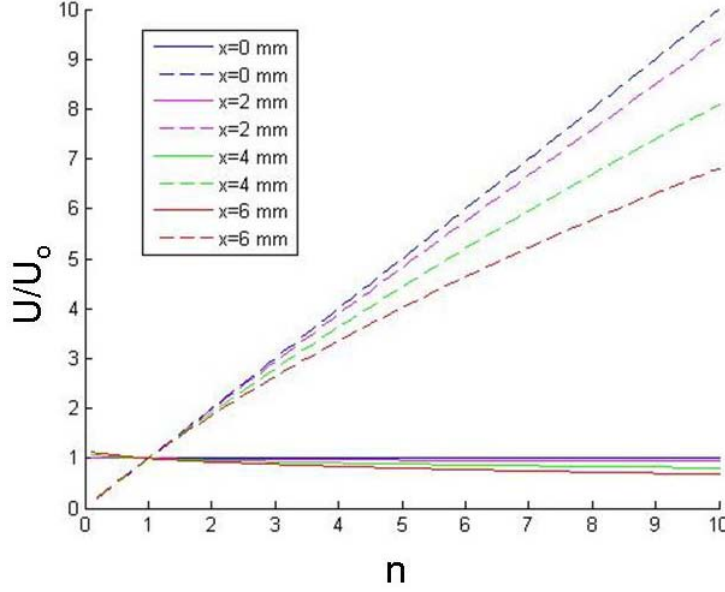
$$0 < \frac{\tilde{U}(n\mu_a, \mu_s)}{U(\mu_a, \mu_s)} \leq 1.$$

Para un medio con mismo coeficiente de absorción que el de referencia y coeficiente de dispersión  $n\mu_s$

$$\frac{\hat{U}(\mu_a, n\mu'_s)}{U(\mu_a, \mu'_s)} = n \exp \left[ -(\sqrt{n} - 1) \sqrt{3\mu_a\mu'_s} (|r_f - r_s| + |r_d - r_f| - |r_d - r_s|) \right] \quad (3.4)$$

$$\text{Ahora, } 0 < \frac{\tilde{U}(\mu_a, n\mu_s)}{U(\mu_a, \mu_s)} \leq n$$

En la *figura 4.1* se muestran los valores de ambos ratios, para un detector situado en diferentes posiciones de la recta (x,0,10) mm, una fuente situada en la posición (0,0,0) y un fluoróforo situado en (0,0,5mm), siendo  $\mu_a = 0.1 \text{ cm}^{-1}$  y  $\mu'_s = 8 \text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 4.1. Líneas continuas.** Representación gráfica de la ecuación 3.3. para diferentes posiciones del detector. **Líneas discontinuas.** Representación gráfica de la ecuación 3.4. para diferentes posiciones del detector.

La gráfica muestra como la razón para cambios en el coeficiente de absorción se mantiene cerca de 1, sin embargo para cambios en el coeficiente de dispersión la razón aumenta con  $n$ , siendo lineal cuando el detector, la fuente y el fluoróforo están alineados.

Si calculamos la proporción que guardan  $\tilde{U}(n\mu_a, \mu_s)$  y  $\tilde{U}(\mu_a, n\mu_s)$  obtenemos

$$\frac{\tilde{U}(\mu_a, n\mu_s)}{\tilde{U}(n\mu_a, \mu_s)} = n \quad (3.5)$$

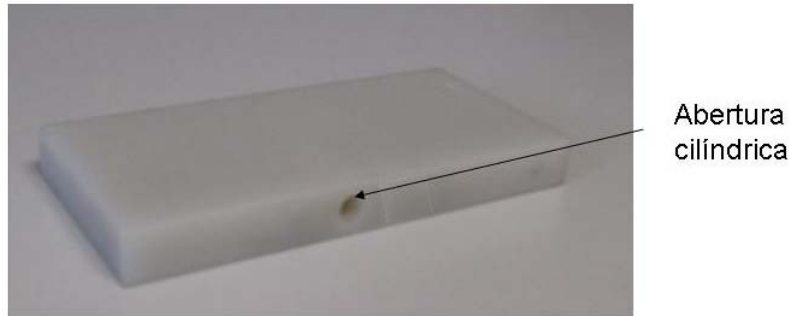
Para un ladrillo se pueden realizar una argumentación similar ya que la densidad fotónica es combinación lineal de la funciones de Green del medio infinito (ver sección 2.2.2). De nuevo se cumple que

$$\frac{\tilde{U}^{ladrillo}(\mu_a, n\mu_s)}{\tilde{U}^{ladrillo}(n\mu_a, \mu_s)} = n \quad (3.6)$$

### 4.2.2 Construcción del maniquí, protocolo de adquisición y simulación

El maniquí base sobre el que se realizaron los experimentos fue de tipo ladrillo de 1 cm de altura basado en resina de poliéster, ajustando las concentraciones de tinta negra y dióxido de titanio para conseguir propiedades ópticas de  $\mu_a = 0.01 \text{ mm}^{-1}$  y  $\mu'_s = 0.8 \text{ mm}^{-1}$ .

Posteriormente se practicó un agujero cilíndrico de 5 mm de diámetro y 5 cm de profundidad, a media altura del ladrillo (*figura 4.2*).



**Figura 4.2.** Fotografía del maniquí utilizado para obtener los datos experimentales. En la abertura cilíndrica se introducía fluido de propiedades ópticas específicas, junto con fluoróforo Alexa Fluor 700 a una concentración de  $1\mu\text{M}$ .

Se creó un maniquí homogéneo de referencia rellenando la región cilíndrica con fluido de propiedades ópticas equivalentes, conformado de Intralipid y tinta [91] disueltos en agua destilada, en las concentraciones apropiadas. Para comprobar la homogeneidad se verificó que no se producían distorsiones en el perfil de luz creado cuando el láser se focalizaba en la superficie del ladrillo. Posteriormente se crearon maniqués heterogéneos rellenando la cavidad con fluidos con diferente coeficiente de dispersión ( $2\mu's$ ,  $3\mu's$  y  $4\mu's$ ) y el mismo coeficiente de absorción. En todos los casos se añadió al fluido el fluoróforo Alexa Fluor 700 a  $1\mu\text{M}$ , siendo por tanto la región cilíndrica fluorescente.

Con respecto al protocolo de adquisición, se seleccionaron  $9 \times 9$  fuentes cubriendo una superficie de  $12 \times 12 \text{ mm}^2$ , localizadas en la parte inferior del ladrillo. Para la reconstrucción se eligieron detectores equivalentes situados en la parte superior.

Todos los experimentos fueron además simulados mediante ordenador, usando el programa de elementos finitos TOAST [7, 12]. Esta herramienta informática resuelve la ecuación de difusión tal y como se describe en el Apéndice 1. Para la obtención de la simulación de los datos se computó un maniquí tipo ladrillo de  $2 \times 2 \times 1 \text{ cm}$  usando un mallado en tetraedros de 145.000 nodos (*figura 4.3*).

Antes de realizar la reconstrucción las densidades fotónica se submuestrearon a 55.000 nodos. Con estos valores se creó la matriz del sistema, que fue a su vez submuestreada sobre un mallado de 20x20x20 vóxeles.

El paquete de elementos finitos TOAST calcula las densidades fotónicas de excitación y fluorescencia resolviendo la siguiente expresión:

$$(\nabla^2 + k_l^2)U_l(r) = -\frac{q_l(r)}{D_l} \quad (3.7)$$

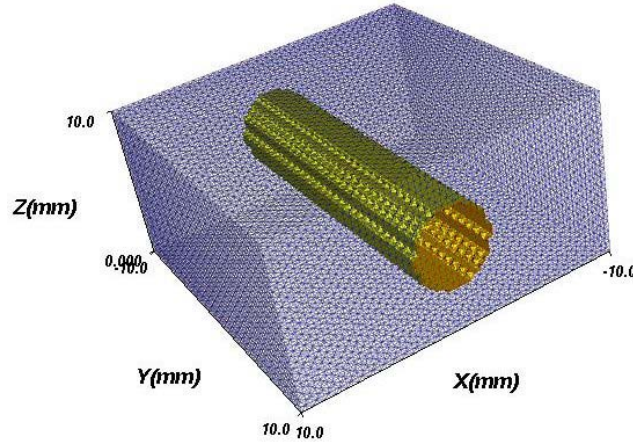
Donde  $l=1$  representa la región cilíndrica y  $l=2$  el resto del maniquí. Esta expresión se resuelve para cada posición de las fuentes en el caso de la densidad fotónica de excitación, mientras que para la fluorescencia se resuelve para cada nodo en el que existe fluoróforo, siendo la ganancia de la fuente la densidad fotónica de excitación previamente calculada (ver ecuación (1.39)).

La condición de frontera en la interfase entre la región cilíndrica y el resto del maniquí es:

$$U_1|_{\Gamma_2} = U_2|_{\Gamma_2} \quad (3.8)$$

La condición de frontera en los bordes del ladrillo es de Robin

$$U(r)|_{\Gamma_1} = -C_{nd} \frac{\partial U(r)}{\partial \hat{n}}|_{\Gamma_2} \quad (3.9)$$



**Figura 4.3.** Mallado de elementos finitos correspondiente al ladrillo. Los nodos correspondiente a la zona cilíndrica sobre la que varía el coeficiente de dispersión

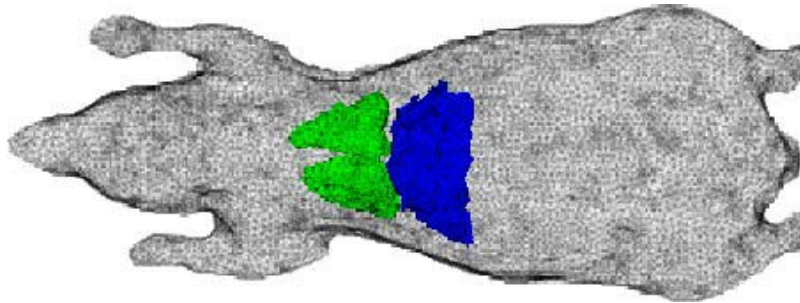
Posteriormente se replicaron todos los experimentos y simulaciones manteniendo constante  $\mu'_s = 0.8 \text{ mm}^{-1}$ , y variando  $\mu_a$ , que tomo los siguientes valores:  $\mu_a = 0.01 \text{ mm}^{-1}$ ,  $\mu_a = 0.02 \text{ mm}^{-1}$ ,  $\mu_a = 0.04 \text{ mm}^{-1}$ ,  $\mu_a = 0.08 \text{ mm}^{-1}$

#### 4.2.3 Reconstrucción del maniquí.

Para cada juego de datos experimentales y simulados se realizaron dos reconstrucciones usando el algoritmo correspondiente a la normalización de Born (ecuación 1.43); calculando la matriz de pesos suponiendo propiedades ópticas homogéneas y modelando la heterogeneidad. Las reconstrucciones fueron realizadas usando el algoritmo ART con 80 iteraciones y un coeficiente de relajación de 1.5, en consonancia con lo expuesto en la sección 3.4.1.

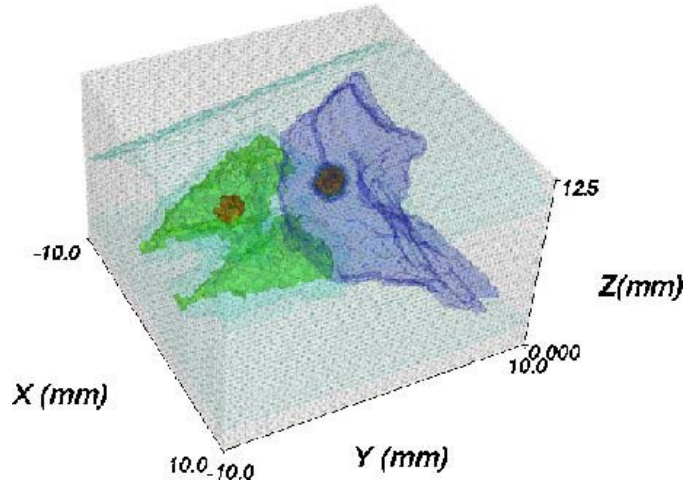
#### 4.2.4 Simulación del modelo de ratón

Con la intención de aproximarse a la situación experimental real, se simularon dos inclusiones fluorescentes de misma concentración en un modelo de ratón heterogéneo, que tuvo en cuenta las propiedades ópticas específicas de dos órganos con coeficientes de dispersión dispares; el pulmón y el hígado. Construimos el mallado basándonos en el atlas anatómico Digimouse [92].



**Figura 4.4.** Mallado de elementos finitos correspondiente al atlas Digimouse. En verde se observan los elementos finitos correspondientes al pulmón, mientras que en azul se observan los elementos finitos correspondientes al hígado.

En concordancia con la geometría de placas paralelas del FDOT, el ratón se simuló rodeado de fluido de propiedades ópticas equivalentes, suponiendo que el sujeto estuviese metido en una cámara de placas paralelas. El mallado se creó seleccionando el pulmón y el hígado del atlas Digimouse y mapeándolo a un mallado de elementos finitos tipo ladrillo de 12.5 mm de altura (figura 4.5). El modelo consta por tanto de cuatro regiones ópticas: pulmón, hígado, fondo del ratón y líquido de propiedades equivalentes.



**Figura 4.5.** Mallado de elementos finitos correspondiente a la zona del atlas Digimouse. En verde se observan los elementos finitos correspondientes al pulmón, mientras que en azul se observan los elementos finitos correspondientes al hígado. Las esferas rojas muestran las inclusiones fluorescentes.

Se realizaron dos simulaciones, la primera suponiendo propiedades ópticas homogéneas ( $\mu_a = 0.01 \text{ mm}^{-1}$  y  $\mu'_s = 0.8 \text{ mm}^{-1}$ ) y la segunda asignándole al pulmón  $\mu'_s = 2.12 \text{ mm}^{-1}$ ,  $0.65 \text{ mm}^{-1}$  al hígado,  $1.22 \text{ mm}^{-1}$  al resto de tejido del ratón y  $1.55 \text{ mm}^{-1}$  a la región de intralipid.

Todas las simulaciones se crearon suponiendo  $10 \times 10$  fuentes equiespaciadas situadas en el plano inferior del mallado cubriendo una zona de  $15 \times 15 \text{ mm}^2$ , con la misma configuración de detectores en el plano superior. Los fluoróforos se crearon como dos esferas de 3 mm de diámetro, una situada en el hígado y otra en el pulmón, cada una de ellas con la misma concentración.

### 4.2.3 Reconstrucción del modelo de ratón

Para los datos simulados con propiedades ópticas homogéneas se realizó una reconstrucción, modelando la matriz de pesos suponiendo las mismas propiedades ópticas. Esta imagen sirvió de referencia para las dos reconstrucciones que se obtuvieron a partir de los datos simulados sobre el modelo de ratón con varios tejidos, correspondientes a una matriz de pesos se construida suponiendo las mismas propiedades ópticas usadas para simular, propiedades ópticas homogéneas con  $\mu'_s = 1 \text{ mm}^{-1}$ . En todos los casos, se usó la relación normalizada de Born y el algoritmo ART con 80 iteraciones y un coeficiente de relajación de 1.5, en consonancia con lo expuesto en la sección 3.4.1.

#### 4.2.4 Cuantificación

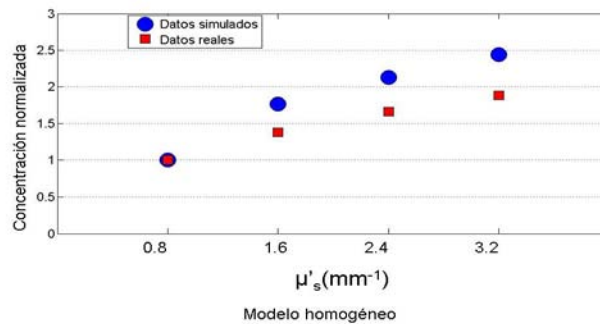
Cada imagen reconstruida se cuantificó escogiendo un umbral correspondiente al valor máximo de los vóxeles dividido entre dos, seleccionando como valor de la cuantificación la media de los vóxeles por encima del umbral. Este método asegura que no existan posibles sesgos que si pueden aparecer realizando cuantificaciones manuales.

### 4.3 Resultados

#### 4.3.2 Maniquí tipo ladrillo: Experimentos y simulaciones

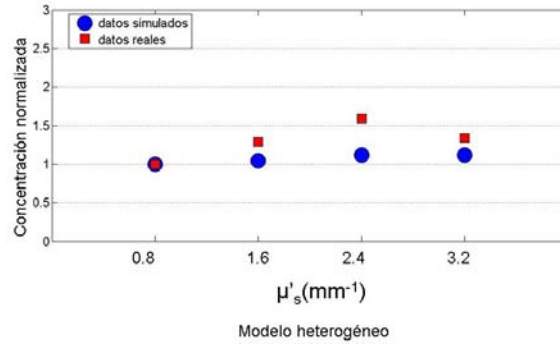
Las reconstrucciones a partir de los datos tanto simulados como experimentales, asumiendo medio homogéneo, muestran errores de cuantificación no despreciables, estando en el rango entre 76-144% y el 38-88% para las simulaciones y los experimentos respectivamente (figura 4.6). Al modelar la heterogeneidad en las matrices de pesos, el error de cuantificación disminuye drásticamente para la simulación y en menor medida para el experimento real (figura 4.7).

En cambio al variar el coeficiente de absorción y modelar la matriz de pesos suponiendo parámetros homogéneos, los errores son pequeños (figura 4.8).

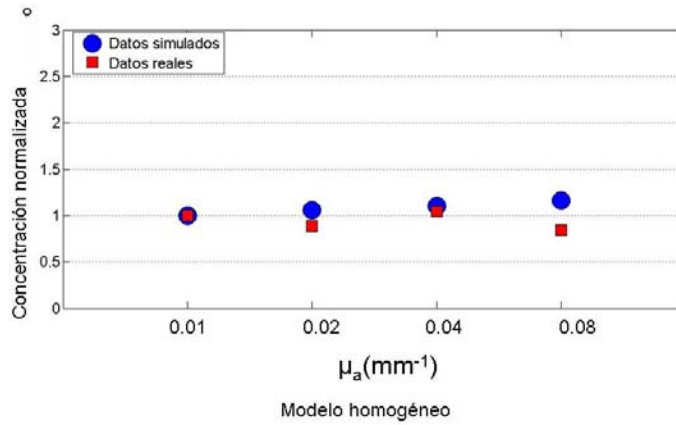


**Figura 4.6.** Resultados de la cuantificación para el maniquí variando el coeficiente de dispersión de la zona cilíndrica, computando la matriz de pesos suponiendo propiedades ópticas homogéneas. Los valores de la cuantificación están normalizados por el valor obtenido para el maniquí homogéneo ( $\mu'_s = 0.8 \text{ mm}^{-1}$ )



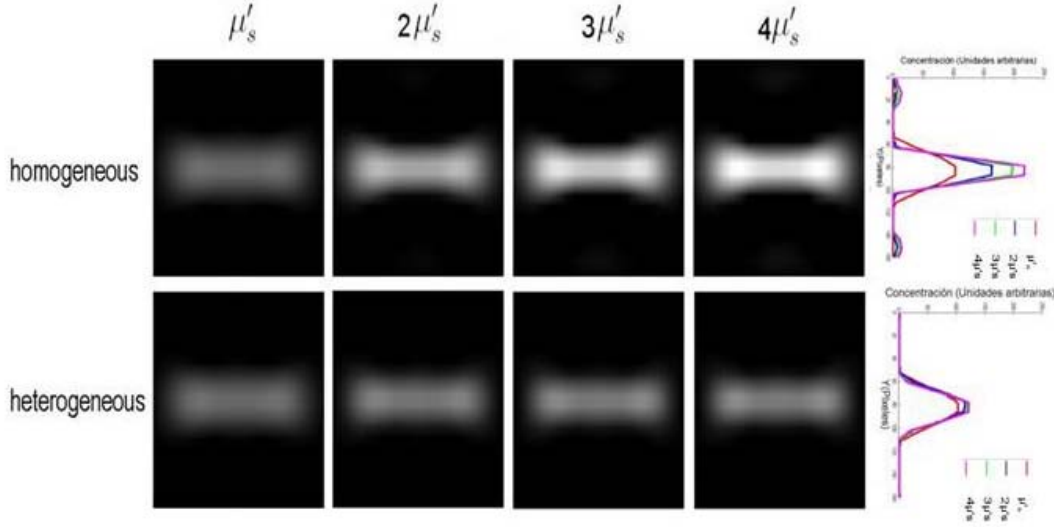


**Figura 4.7.** Resultados de la cuantificación para el maniquí variando el coeficiente de dispersión de la zona cilíndrica, computando la matriz de pesos suponiendo propiedades ópticas heterogéneas. Los valores de la cuantificación están normalizados por el valor obtenido para el maniquí homogéneo ( $\mu'_s = 0.8 \text{ mm}^{-1}$ )-



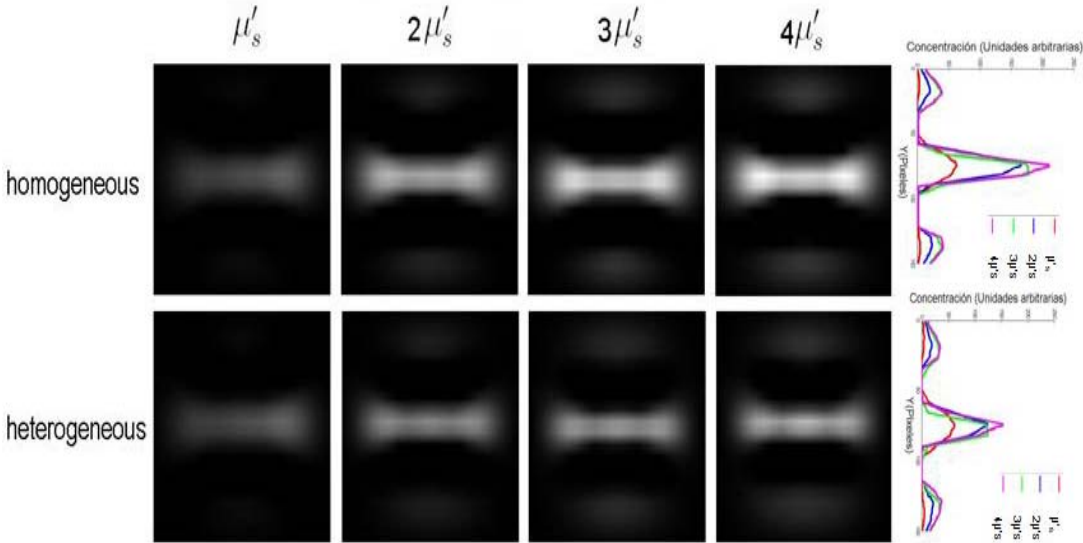
**Figura 4.8.** Resultados de la cuantificación para el maniquí variando el coeficiente de absorción en la zona cilíndrica y computando la matriz de pesos suponiendo propiedades ópticas homogéneas. Los valores de la cuantificación están normalizados por el valor obtenido para el maniquí homogéneo ( $\mu_a = 0.01 \text{ mm}^{-1}$ )-

En la *figura 4.9* se muestra el corte coronal central (plano  $z=0.5 \text{ cm}$ ) de las reconstrucciones obtenidas a partir de los datos simulados asumiendo modelo homogéneo y heterogéneo. La asunción de parámetros constantes hace que la cuantificación sea irreal, mejorando cuando se modela la heterogeneidad.



**Figura 4.9.** Corte coronal central de las reconstrucciones obtenidas a partir de los datos simulados con diferentes coeficientes de dispersión en la zona cilíndrica, asumiendo propiedades ópticas constantes para plantear el problema directo (arriba) y usando la distribución heterogénea de  $\mu'_s$  (abajo). A la derecha se observan los perfiles trazados en la línea vertical central de las imágenes.

En la *figura 4.10* se muestran los cortes coronales equivalentes obtenidos a partir de los datos experimentales. Se puede observar como en este caso el modelado de la heterogeneidad también mejora la cuantificación.



**Figura 4.10.** Corte coronal central de las reconstrucciones obtenidas a partir de los datos experimentales con diferentes coeficientes de dispersión en la zona cilíndrica, asumiendo propiedades ópticas constantes para plantear el problema directo (arriba) y usando la distribución heterogénea de  $\mu'_s$  (abajo). A la derecha se observan los perfiles trazados en la línea vertical central de las imágenes.

### 4.3.2 Ratón con diferentes tejidos.

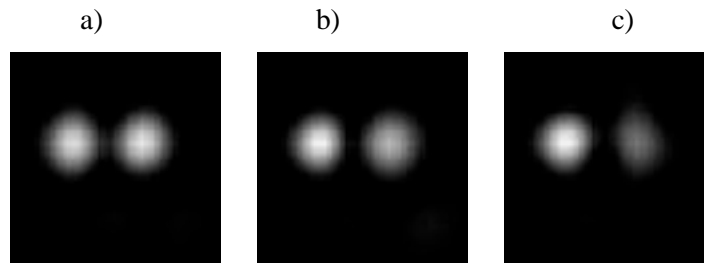
En la tabla 4.2 se muestran los resultados de la cuantificación para la concentración de fluoróforo en el pulmón derecho, en el hígado y la proporción entre las dos, para todas las combinaciones del modelo usado para simular y el usado en la matriz de pesos para reconstruir.

En todos los caso, la proporción entre la cantidad de fluoróforo en el pulmón y en el hígado debe ser cercana a uno sin embargo, al usar un modelo de reconstrucción homogéneo con datos obtenidos de un medio con heterogeneidades de dispersión, se introducen errores relevantes en la cuantificación, siendo el ratio igual a 1.86. Modelando la heterogeneidad, el ratio es 1.16.

**Tabla 4.2.** Resultados de las cuantificación para las diversas simulaciones y los modelos utilizados para la reconstrucción.

Modelo para la simulación de los datos	Modelo para el cálculo de la matriz de pesos	Cuantificación en el hígado (CHig)	Cuantificación en el pulmón (CPul)	CHig/ CPul
Homogéneo	Homogéneo	1.18	1.11	0.94
Heterogéneo	Heterogéneo	1.06	1.23	1.16
Heterogéneo	Homogéneo	0.89	1.65	1.86

En la *figura 4.11* mostramos las rodajas centrales sagitales de la reconstrucción en las que se observa las esferas fluorescentes situadas en el hígado y en el pulmón.



**Figura 4.11.** Corte coronal central de las reconstrucciones obtenidas a partir de los datos experimentales con diferentes coeficientes de dispersión en la zona cilíndrica. **a)** Modelo para la simulación homogéneo, modelo para la reconstrucción homogénea. **b)** Modelo para la simulación heterogéneo, modelo para la reconstrucción heterogéneo. **c)** Modelo para la simulación heterogéneo, modelo para la reconstrucción homogéneo.

#### **4.4 Discusión y conclusiones**

Hemos estudiado el efecto de las heterogeneidades de dispersión sobre las medidas cuantitativas de la distribución de fluoróforos con FDOT a partir de datos normalizados.

Haciendo un análisis matemático del ratio de Born, hemos mostrado que para el caso más sencillo (medio infinito y homogéneo), los datos son sensibles a cambios en el coeficiente de dispersión.

A la hora de reconstruir un maniquí simulado con una región heterogénea cilíndrica, los resultados muestran con claridad que la asunción de propiedades ópticas homogéneas conduce a cuantificaciones erróneas para niveles altos de heterogeneidad de dispersión. Este error se puede mitigar modelando las heterogeneidades en la matriz de pesos. Sería esperable que no se obtuviese error en las cuantificaciones usando el mismo modelo en el problema inverso que en la simulación, sin embargo se obtienen pequeñas desviaciones, debido a que el mallado usado para reconstruir procede de un muestreo del mallado usado para simular.

Para los datos experimentales análogos a los simulados, hemos obtenido resultados similares. En este caso la mejora conseguida al modelar las heterogeneidades es menor que en las simulaciones, debido a diferentes fuentes de error: en primer lugar, el líquido de propiedades ópticas equivalentes tiene un índice de refracción que difiere del de la resina ( $n=1.33$  vs  $n=1.41$ ). Esto implica un error de modelado en las condiciones de frontera entre la zona cilíndrica y el resto del ladrillo [11]. También hay que incluir el error de posicionamiento de la heterogeneidad y los posibles errores a la hora de modular el coeficiente de dispersión tanto en la zona cilíndrica como en el ladrillo [93].

Hemos encontrado tanto en el análisis matemático, como en las simulaciones y en los experimentos, que la aproximación normalizada de Born es robusta frente a heterogeneidades de absorción, en concordancia con los resultados obtenidos en los trabajos previos [61].

Como era de esperar, los resultados se mantienen para una simulación de un experimento realista sobre un ratón con diferentes tejidos. Esta situación ha sido estudiada previamente en [62], donde simulan inclusiones fluorescentes en el torso de un ratón heterogéneo, creado a partir de una imagen de CT. Sin embargo, sus resultados no disciernen entre el efecto de la absorción y el efecto de la dispersión y analizan el efecto sobre el error de reconstrucción usando el error de norma 2, lo que impide una comparación directa de sus resultados con los nuestros.

En conclusión, hemos demostrado que no modelar el coeficiente de dispersión conduce a errores de cuantificación en las reconstrucciones al usar datos normalizados. Por lo tanto, los resultados de

FDOT a la hora cuantificar entre órganos con diferentes  $\mu'_s$ , usando la relación normalizada de Born, deben tomarse con precaución, siendo necesario el uso apriorístico de la distribución del coeficiente de dispersión

.

## Capítulo 5

*A lo largo de esta tesis se han explicitado los puntos débiles de la técnica FDOT en lo referente a las omisiones de las aproximaciones comúnmente utilizadas a la hora de plantear las ecuaciones del problema tomográfico (Capítulo 4). La inclusión de información a priori anatómica en la matriz de pesos se perfila como la solución a este problema.*

*Con estos argumentos en mente, hemos diseñado y construido una máquina híbrida FDOT-CT. En este capítulo especificamos los detalles del sistema, que permite obtener adquisiciones tanto en el modo de placas paralelas como en el modo rotatorio, realizándose una comparativa entre ellos.*

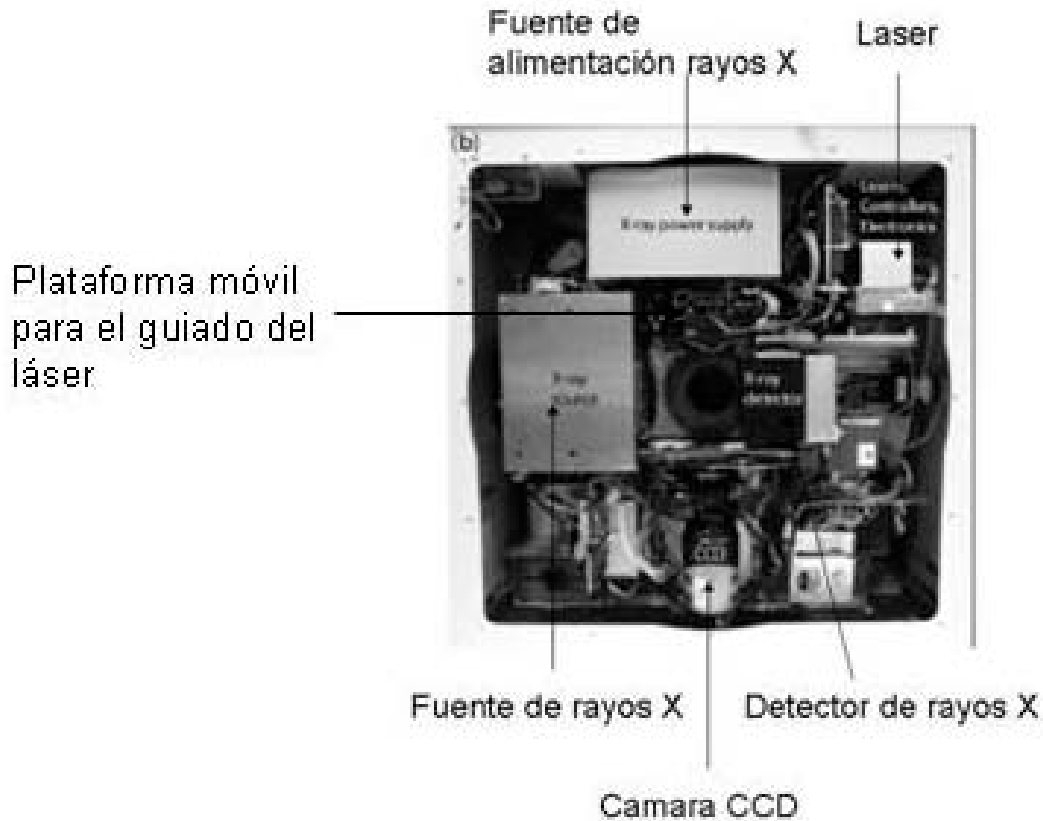
### 5. FDOT-CT.

#### 5.1 Introducción

La FDOT es una técnica de imagen molecular de baja resolución, por lo tanto es común que debido a la falta de información anatómica el usuario no sea capaz de interpretar el contenido de las imágenes reconstruidas. La combinación en un mismo sistema de la técnica FDOT con una técnica de alta resolución morfológica como el CT permite fusionar en una misma imagen contenido anatómico e información molecular, solventando este problema. Pero la combinación de estas dos técnicas va más allá de una simple superposición de imágenes, la información anatómica puede utilizarse como información a priori en el problema directo de FDOT [62], o en el problema inverso [70, 72, 94-97] mejorando la calidad de las reconstrucciones (ver Apéndice 3). En el capítulo 4 de esta tesis se demuestra que el conocimiento apriorístico de la distribución del coeficiente de dispersión y su introducción en el problema directo, supone una mejora en la precisión de la cuantificación. Obtener esta distribución de la imagen de CT es una hipótesis plausible.

Por estas razones son varios los grupos investigadores que se han lanzado en los últimos dos años a la construcción de máquinas híbridas FDOT/CT. En [27] se presenta un sistema comercial CT (eXplore Locus, General Electric HealthCare, London, ON, Canadá) en cuyo gantry se añade un sistema FDOT en modo de transmisión, similar al discutido en la sección 2.2 [69] El sistema rota

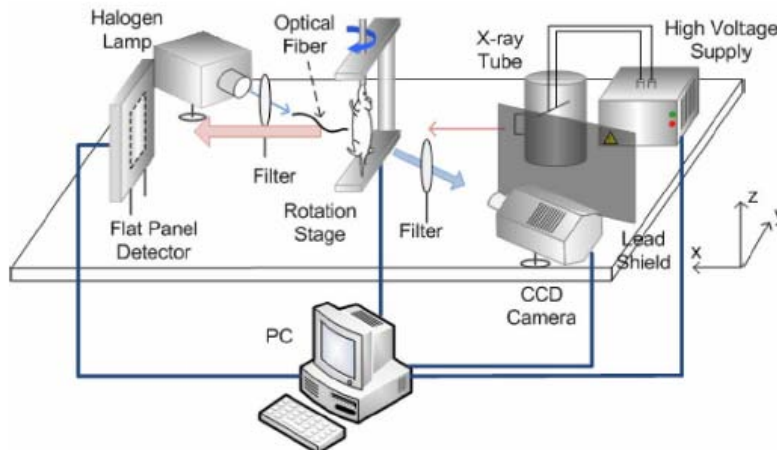
alrededor del sujeto, permitiendo la adquisición de diferentes proyecciones geométricas, pero sin permitir la adquisición en modo placas paralelas.



**Figura 5.1.** Interior del aparato FDOT/CT descrito en [27]. La imagen muestra el interior de un tomógrafo CT eXplore Locus, de General Electric HealthCare al que se ha añadido los elementos de un FDOT . La luz parte de un diodo láser y se conduce mediante fibra óptica hasta el sujeto. Una plataforma móvil permite seleccionar las fuentes.

En [98] se opta por un sistema de características similares, pero fijando los elementos detectores y emisores siendo el sujeto el que rota, situado en posición vertical. Esta configuración no es óptima, ya que el movimiento del sujeto añade artefactos de movimiento a la imagen reconstruida [99].





**Figura 5.2.** Esquema del sistema híbrido propuesto en [98]. El sujeto se sitúa en vertical. Un motor permite que rote sobre sí mismo. Los elementos emisores y detectores de los sistemas de rayosX y óptico se encuentran fijos, sobre una plataforma.

En el sistema presentado en [29] el hardware de emisión y detección tiene una configuración análoga a la de [98], pero en esta ocasión el subsistema FDOT no permite la adquisición de varias proyecciones geométricas.

Simultáneamente a estos trabajos hemos construido un prototipo FDOT sobre un CT fabricado en nuestro laboratorio. Los elementos de detección y emisión se encuentran anclados a un gantry rotatorio, manteniéndose el sujeto inmóvil [70-71] y permitiendo realizar adquisiciones de FDOT tanto en modo placas paralelas como en modo múltiples proyecciones.

El prototipo ha sido probado en modo placas paralelas, haciendo un experimento con un maniquí tipo ladrillo (E1) y un experimento con un ratón sacrificado, en el cual se ha introducido un capilar relleno de fluoróforo (E2).

En trabajos previos, se ha demostrado mediante la técnica de análisis de valores singulares [31] que la adquisición en modo rotatorio ofrece un rendimiento superior a la adquisición en placas paralelas [34], sin embargo este trabajo no tiene en cuenta la posibilidad de que, en el modo placas paralelas, el sujeto se puede comprimir levemente, reduciendo el espesor de la muestra y mejorando por tanto el condicionamiento del problema [79] (ver sección 2.3). En este capítulo estudiamos este problema, comparando ambos modos de adquisición, mediante simulaciones (de S1 a S10) usando el programa de elementos finitos TOAST y experimentos reales (E3, E4).

Del mismo que se procede en [34], hemos simulado varias adquisiciones en rotación (S1, S2, S3, S4) sobre cilindros en cuyo interior hay dos esferas fluorescentes. Para cada adquisición las esferas se han situado alineadas en planos diferentes. En todos los casos se ha tomado la distribución óptima de fuentes y detectores [34]. Basándonos en el mismo estudio hemos simulado la adquisición en placas paralelas (S5, S6, S7, S8) sobre ladrillos en cuyo interior hay

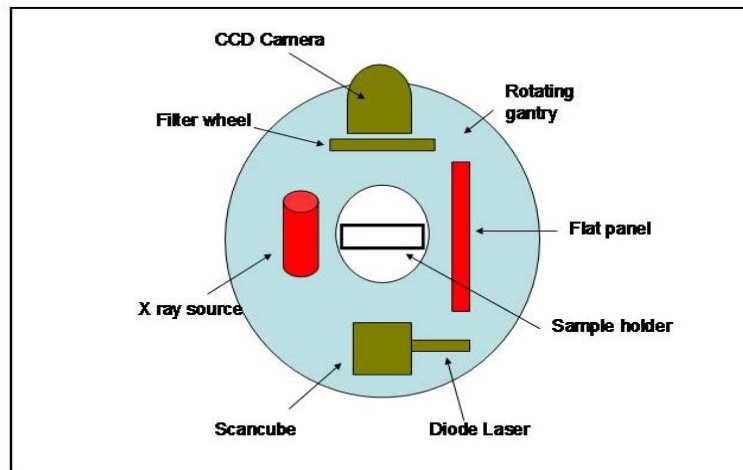
dos esferas fluorescentes situadas en diferentes planos. Para cada adquisición las esferas se han situado alineadas en planos diferentes. De nuevo, en todos los casos se ha usado la distribución óptima de fuentes y detectores. Para observar el efecto de la reducción de espesor se ha variado el diámetro del cilindro y la altura del ladrillo.

Posteriormente hemos simulado las mismas dos esferas fluorescentes situadas en diferentes planos sobre el atlas anatómico Digimouse (S9, S10) y hemos comparado las reconstrucciones con las que se obtienen con el caso del ladrillo. Con respecto a los experimentos reales, hemos usado un ratón, con un capilar situado en el esófago, sobre el que se han adquirido los datos en ambos modos comparando las reconstrucciones (E3, E4).

## 5.2 Materiales y métodos

### 5.2.1 Diseño del sistema FDOT/CT

La idea subyacente al diseño del FDOT/CT es la co-planaridad: situando los elementos detectores y emisores de ambas técnicas ortogonales y en el mismo plano (*figura 5.3*), se permite la posibilidad de que las reconstrucciones obtenidas por ambos subsistemas estén intrínsecamente registradas, tras una calibración adecuada[100-101]. Idealmente la línea recta que une el centro del detector y las fuentes para ambas técnicas quedan perpendiculares y se cortan en el centro del FOV.



**Figura 5.3.** Esquema conceptual del prototipo FDOT/CT. En azul se muestra el disco rotatorio. En verde los elementos correspondientes al subsistema FDOT, y en rojo los correspondientes al subsistema CT.

Todos los elementos se sitúan anclados a un gantry rotatorio de aluminio y 15 milímetros de grosor. En la *figura 5.4* se muestra una imagen del sistema en la que se pueden observar sus elementos.



**Figura 5.4.** Fotografía del sistema FDOT/CT. 1) Emisor de rayos X. 2) Cámara CCD. 3) Revolver de filtros. 4) Detector de rayos X. 5) Módulo láser junto al sistema de espejos movidos por galvanómetros que permite que su focalización en los puntos deseados de muestra.

Un blindaje de plomo solidario con el gantry, protege al usuario de la radiación X.

Para permitir la rotación, el cableado se conduce desde el gantry hasta los elementos de control a través de una cadena articulada. En la *figura 5.5* se muestra el prototipo completo



**Figura 5.5.** Fotografía del sistema incluyendo el blindaje de plomo y la cadena.

### 5.2.2 Subsistema FDOT

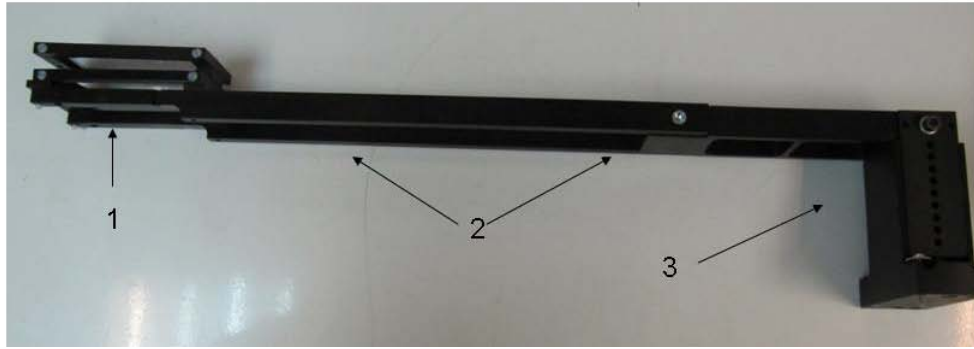
El subsistema FDOT consta de muchos de los elementos de la máquina descrita en la sección 3.2.1. El elemento detector es una cámara CCD (ORCA II, Hamamatsu, Ciudad de Hamamatsu, Japón) y el objetivo (Nikon). El láser se dirige hacia la muestra mediante dos espejos movidos mediante galvanómetros, (Scancube 7, AG Scanlab, Puchheim, Alemania).

La radiación láser la genera un sistema basado en un diodo emisor (Monocrom, Barcelona, España) a una longitud de onda de  $675 \pm 5$  nm. La potencia entregada se controla mediante una señal TTL (período 500  $\mu$ s). Un revolver de filtros (IFW, Optec, Lowell, Michigan) situado frente a la cámara CCD permite seleccionar la longitud de onda de fluorescencia y de excitación. El revólver es capaz de albergar cinco filtros y se controla mediante señales del puerto serie que se invocan con un comando incluido en el programa de adquisición (ver apéndice 5).

Se han construido dos portasujetos, uno específico para la adquisición en placas paralelas y otro específico para la adquisición en modo varias proyecciones geométricas. En la primera, las placas son de metacrilato, de 1.5 mm de espesor. Este material, al contrario que el cristal antirreflectante, no produce artefactos en la imagen de CT, conservado la rigidez suficiente para comprimir levemente al sujeto manteniendo fronteras planas. La segunda consiste en dos varillas de fibra de carbono de 30 cm de longitud y 2 milímetros de diámetro, anclados a un soporte, quedando paralelas a una distancia de 3 cm. Para su uso, ambos portasujetos se anclan a una etapa de desplazamiento lineal, que introduce al sujeto automáticamente en interior del gantry por la zona opuesta al blindaje de plomo.



**Figura 5.6.** Fotografía de la cama específica para adquisición en rotación. El sujeto se sitúa entre las varillas de fibra de carbono, permitiendo que se ilumine en distintas zonas. Las varillas están unidas a un brazo rectangular, que permite su acoplo a una plataforma situada sobre una etapa de desplazamiento lineal que introduce al sujeto en el tomógrafo.



**Figura 5.7.** Vista lateral de la cama específica para la adquisición en modo placas paralelas. La muestra se introduce entre dos placas de metacrilato quedando levemente comprimido. Las placas se encuentran en un cassette (1) unido a dos brazos (2) que finalizan en una plataforma (3). Esta plataforma se une a una etapa de desplazamiento lineal, introduciendo al sujeto en el gantry por su parte trasera.

### 5.2.3 Subsistema CT

El sistema CT previo consiste en un tomógrafo de haz cónico cuyos elementos principales son una fuente de rayos X micro-foco, que permite alcanzar una potencia de 50 W, una energía pico del haz de hasta 110 keV, con un tamaño de foco de  $15\mu\text{ m}$ . y un detector de rayos X de área o tipo “flat-panel”, con un tamaño de píxel de  $50\mu\text{ m}$ .

Para dotar al sistema de la máxima versatilidad, el detector de rayos X fue montado sobre una etapa de desplazamiento lineal que permite modificar la geometría de adquisición del equipo, obteniendo un tamaño de campo de visión y resolución espacial variables, así como dotando de la flexibilidad necesaria para la implementación de trayectorias de adquisición no circulares. Asimismo, la variación del campo de visión y resolución permite la obtención de imagen de órganos concretos con muy alta resolución sin artefactos de truncamiento, proceso de gran interés para proporcionar información complementaria a FDOT.

El sistema cuenta con un sistema de control de motores para la sincronización de movimientos de todos los elementos motorizados. Todo el proceso de adquisición es automático, permitiendo ejecutar los diferentes protocolos de adquisición y calibración del equipo mediante una sencilla orden. Para lograr este grado de automatización se ha desarrollado un conjunto de herramientas informáticas escritas en lenguaje C. Asimismo, se han desarrollado las aplicaciones informáticas necesarias para obtener los datos de calibrado completo del sistema a partir de los datos adquiridos.

Por otra parte, se ha dotado al equipo de un conjunto de sistemas de seguridad que permiten la adquisición de datos evitando cualquier fuga de radiación. En concreto, el equipo dispone de un blindaje incorporado en el anillo rotatorio, de un sistema de interruptores de seguridad que impide

la operación en caso de fallo en el sistema de blindaje, de un interruptor de parada de emergencia que puede ser activado por el usuario en cualquier momento.

Se ha desarrollado una aplicación informática para la reconstrucción de los datos adquiridos por el equipo, siguiendo la aproximación analítica para la reconstrucción de datos tomográficos en adquisición circular de haz cónico propuesta por Feldkamp [102] .

#### 5.2.4 Experimento con maniquí (E1)

Para comprobar el funcionamiento del sistema se realizó un experimento en modo placas paralelas de un maniquí tipo ladrillo basado en resina de poliéster de propiedades ópticas  $\mu_a = 0.1 \text{ cm}^{-1}$  y  $\mu'_s = 8 \text{ cm}^{-1}$ . Las dimensiones del ladrillo fueron de 5x5x1 cm. La adquisición FDOT se realizó seleccionando 42 fuentes con espaciado constante sobre una región de 1cm x1cm, en la base. Se introdujo en el maniquí un capilar a una distancia de 1.5 mm de la superficie en cuya punta se insertaron 2  $\mu\text{L}$  de Alexa Fluor 680 a una concentración de  $1.5 \times 10^4 \text{ nM}$ .

Para conseguir el registro de ambas imágenes se colocaron cuatro puntos fiduciales de pumita. Estos puntos son visibles tanto en la reconstrucción de CT como en la imagen de referencia de FDOT. La transformación rígida que lleva al registro de la imágenes se encontró realizando un ajuste mediante descomposición en valores singulares [103] (ver Apéndice 4). El problema directo se planteo usando aproximación normalizada de Born. Puesto que las fronteras son planas, la matriz de pesos se calculó usando el método de las imágenes. Se reconstruyo la imagen usando 80 iteraciones del algoritmo ART, con un coeficiente de relajación de 1.5.

#### 5.2.5 Experimento con ratón (E2)

Para comprobar la capacidad del equipo para realizar imagen de ratón, se introdujo un capilar con 2  $\mu\text{L}$  del fluoróforo Alexa Fluor 680 en su punta, en el esófago de un ratón previamente sacrificado. La adquisición se realizó en modo placas paralelas, seleccionando 48 fuentes equiespaciadas sobre un área de 1cm x 1cm situada en el torso del espécimen. Para conseguir el registro de ambas imágenes se practicaron cuatro taladros de radio en torno a 1 mm sobre la ventana de metacrilato del portasujetos. Estos puntos son visibles tanto en la reconstrucción de CT como en la imagen de referencia de FDOT. La transformación rígida que lleva al registro de la imágenes se encontró realizando un ajuste por mínimos cuadrados [103] (ver Apéndice 5). El problema directo se planteo usando aproximación normalizada de Born (ecuación 1.43). La matriz de pesos se calculó usando el método de las imágenes. Se reconstruyo la imagen usando 80 iteraciones del algoritmo ART, con un coeficiente de relajación de 1.5.

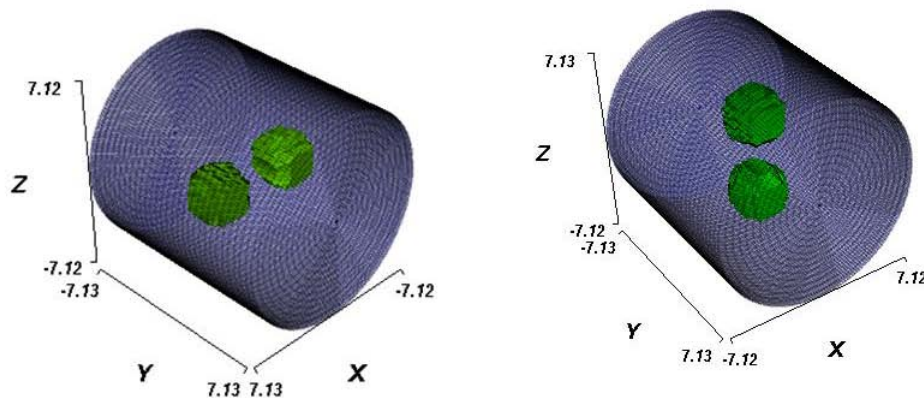
## 5.2.6 Simulaciones adquisición en placas paralelas vs adquisición en rotación.

### 5.2.6.1 Justificación de las simulaciones

De acuerdo con [104], un ratón anestesiado de anchura antero-posterior máxima 20 mm (el grosor máximo del atlas anatómico Digimouse es de 19.7 mm), se puede comprimir entre placas rígidas antireflectantes hasta alcanzar los 14 mm, sin alterar sus funciones vitales. Por nuestra experiencia experimental sabemos que se puede llegar a los 13 mm, sin perjuicio para el animal. Por lo tanto, para simular la adquisición en placas paralelas hemos computado el maniquí tipo ladrillo de 20 x 10 x 13 mm (ratón comprimido), y de 20 x 20 x 20 mm (ratón sin comprimir). En un primer paso la adquisición en rotación ha sido simulada como un cilindro [34]. Posteriormente se ha simulado un ratón completo, a partir del atlas anatómico Digimouse.

### 5.2.6.2 Simulación cilindro (S1, S2, S3, S4) vs ladrillo (S5, S6, S7, S8)

Para simular la adquisición en rotación hemos creado dos cilindros de 20 mm (S1, S2) y dos de 15 mm (S3, S4) de diámetro, construyendo mallados de elementos tetraédricos, usando las funciones propias de la herramienta informática TOAST, sobre los que se han creado 2 distribuciones diferentes de fluoróforos. Las dos distribuciones consisten en dos esferas de 4 mm de diámetro separadas 6 mm entre sus centros. El punto medio del segmento que une los centros de las esferas está situado en el centro geométrico del cilindro, variando entre cada distribución la dirección del eje que une sus centros (X (S1, S3) y Z (S2, S4) respectivamente, *figura 5.8*).



**Figura 5.8.** Mallados utilizados para simular la adquisición en rotación para el cilindro de 15 mm de diámetro (S3 izquierda, S4 derecha). La distribución de fluoróforo está representada en color verde. El punto medio del segmento que une los centros de las esferas está situado en el centro geométrico del maniquí, variando entre cada distribución la dirección del eje que une sus centro (x y z respectivamente).

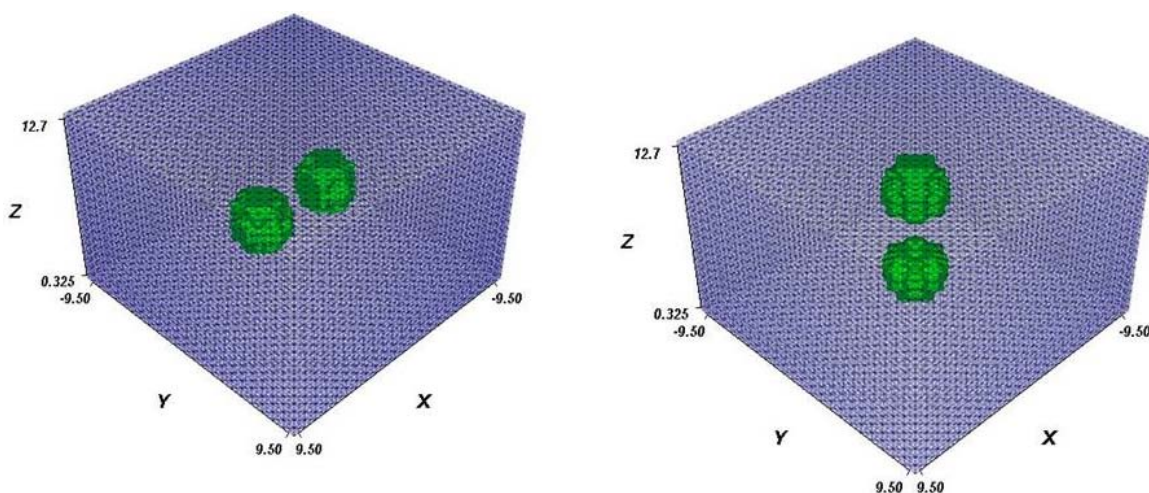


De acuerdo con [34] para un objeto difusivo cilíndrico, el número de proyecciones geométricas de FDOT óptimo es de 15. Por cada proyección los detectores cubren un arco de  $150^\circ$  con un espaciado angular de  $5^\circ$  ( $\sim 0.9\text{mm}$ ) y las fuentes deben ser 3 y cubrir un arco de  $120^\circ$  (ver *figura 5.12* para un ejemplo con la simulación de ratón). Siguiendo estas indicaciones hemos calculado las posiciones de las fuentes y detectores óptimas de los cilindros.

Para la simulación de la adquisición en placas paralelas hemos generados dos ladrillos de  $20 \times 20 \times 20 \text{ mm}$  (S5, S6) y  $20 \times 20 \times 13 \text{ mm}$  (S7, S8) contruyendo mallados de elementos finitos tetraédricos, usando las funciones propias del paquete informático TOAST. Sobre ellos se han creado 2 distribuciones diferentes de fluoróforos, consistentes en dos esferas de  $4 \text{ mm}$  de diámetro separadas  $6 \text{ mm}$  entre sus centros (*figura 5.9*). El punto medio del segmento que une los centros de las esferas está situado en el centro geométrico del ladrillo, variando entre cada distribución la dirección del eje que une sus centro ( $x$  (S5, S7) y  $z$  (S6, S8) respectivamente).

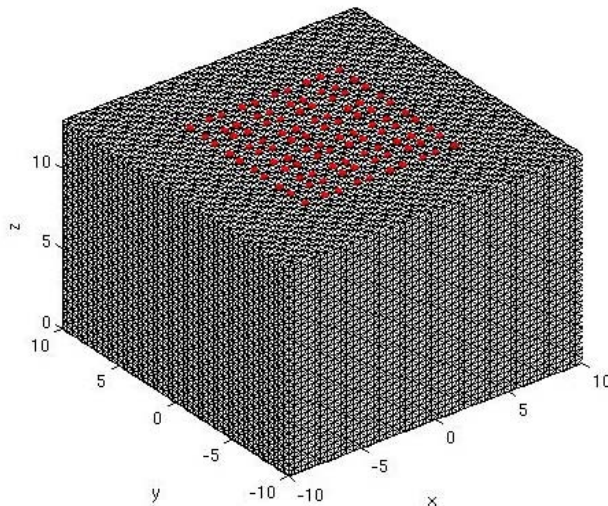
En este caso se han simulado 100 detectores equiespaciados sobre un cuadrado de  $10 \times 10 \text{ mm}$ , sobre el plano XY superior del ladrillo (*figura 5.10*). Las fuentes se han simulado en las mismas posiciones, pero en el plano inferior

Para realizar la reconstrucción, la matriz de pesos se calculo usando el mallado original y muestreándose posteriormente sobre una volumen cúbico de  $20 \times 20 \times 20$  vóxeles, que engloba toda la región determinada por el FOV de los detectores.



**Figura 5.9.** Mallados utilizados para simular la adquisición en placas paralelas para el ladrillo de  $13 \text{ mm}$  de altura (S7 izquierda, S8 derecha). La distribución de fluoróforo está representada en color verde. El punto medio del segmento que une los centros de las esferas está situado en el centro geométrico del maniquí, variando entre cada distribución la dirección del eje que une sus centro ( $x$  y  $z$  respectivamente).



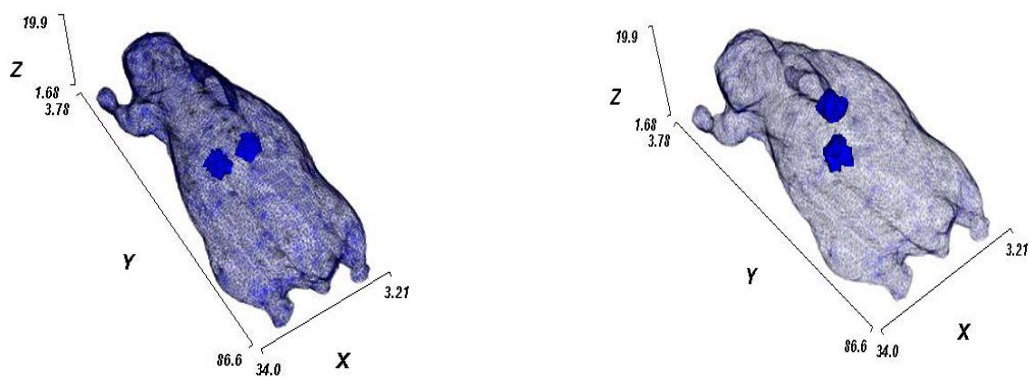


**Figura 5.10.** Representación de los detectores (puntos de color rojo), sobre el maniquí (escala de grises), para las simulaciones S7 y S8.

### 5.2.6.3 Simulación ratón (S9,S10) sin comprimir vs ratón comprimido (S7,S8).

Valiéndonos de atlas anatómico Digimouse, y el software de elementos finitos TOAST, hemos simulado dos experimentos sobre un ratón, cada uno con un posicionamiento de fluoróforos diferente. Las dos distribuciones consisten en dos esferas fluorescentes de 4mm de diámetro, con distancia entre los centros de 6mm, diferenciándose en la dirección del eje que une sus centros, siendo el X, y el Z respectivamente (*figura 5.11*) el punto medio del segmento que une los centros de las esferas está situado en la coordenada del atlas Digimouse [92], que equivale a un punto situado en torno centro del abdomen. Las tres mallas están conformadas por elementos finitos tetraédricos, que se calcularon usando la herramienta informática Amira, debido a que los tetraedros proporcionados por el atlas Digimouse no reunían las condiciones necesarias para la estabilidad de la solución numérica.

Para realizar la reconstrucción, la matriz de pesos se calculo usando el mallado original y muestreándose posteriormente sobre una volumen cúbico de 20x20x20 vóxeles, que engloba toda la región determinado por el FOV de los detectores (*figura 5.11*). La reconstrucción se realizó utilizando 80 iteraciones del algoritmo ART, con coeficiente de relajación 1.5.

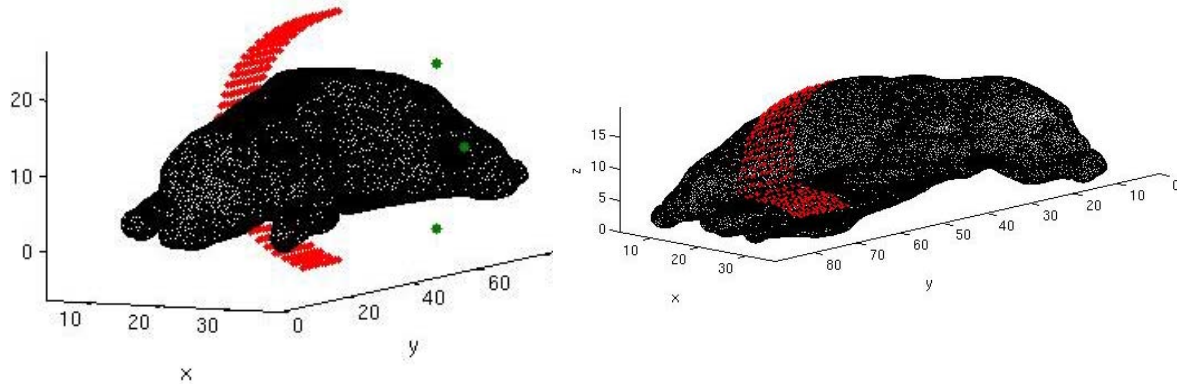


**Figura 5.11.** Izquierda: Mallado utilizado para simular el ratón sin comprimir, con dos esferas fluorescentes situadas a lo largo de eje x (S9). Derecha: Mallado utilizado para simular el ratón sin comprimir, con dos esferas fluorescentes situadas a lo largo de eje z (S10)

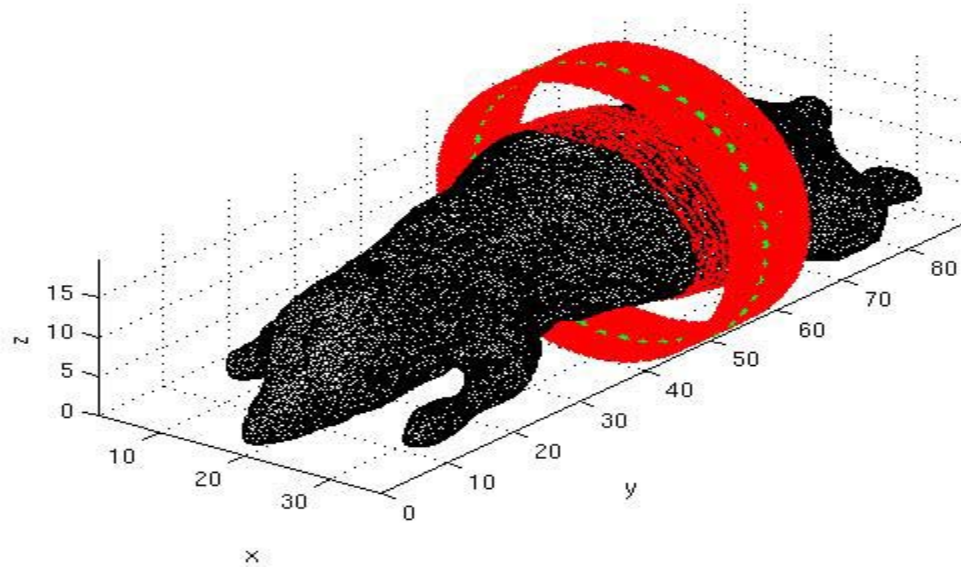
De acuerdo con el estudio de valores singulares presentado en [34] para un objeto difusivo cilíndrico, el número de proyecciones geométricas óptimo es de 15. Por cada proyección los detectores cubren un arco de  $150^\circ$  con un espaciado angular de  $5^\circ$  ( $\sim 0.9\text{mm}$ ) y las fuentes deben cubrir un arco de  $120^\circ$ , siendo 3 su número. De acuerdo a estas indicaciones hemos calculado los parámetros óptimos para un cilindro y posteriormente hemos proyectado las fuentes y los detectores sobre la superficie del atlas Digimouse.

Concretamente hemos simulado 15 proyecciones geométricas equiespaciadas angularmente. Cada una de ellas está compuesta por 12 arcos de detectores, cada uno de los cuales abarca  $150^\circ$  habiendo 31 detectores por arco. En la dirección Y los arcos cubren una distancia de 11 mm, englobando perfectamente a los objetos fluorescentes. Por cada proyección cada fuente se combina con todos los detectores generando  $31 \times 12 \times 3$  pares detector-fuente por proyección. En total se generaron 5.580 detectores, 45 fuentes y 16.740 pares detector-fuente.

Para simular el ratón comprimido hemos utilizado los mallados, fuentes y detectores S7 y S8, descritos en la sección 5.2.6.2.



**Figura 5.12.** **Izquierda:** Fuentes (puntos verdes) y detectores (puntos rojos) correspondientes a una de las proyecciones geométricas sobre un hipotético cilindro de 17 mm de radio, junto con el atlas anatómico Digimouse. Hay tres fuentes con una separación de 40 grados y 12x31 detectores, que están distribuidos en 12 arcos que cubren una distancia de 11 mm en el eje y. Cada arco cubre 150 °. **Derecha:** Proyección de los detectores sobre el atlas anatómico Digimouse.



**Figura 5.13.** En esta imagen se muestran detectores (puntos rojos) y las fuentes (puntos verdes) en mallado correspondiente a las simulaciones de ratón (S9 y S10). Los detectores aparecen proyectados y sin proyectar sobre el atlas anatómico Digimouse.

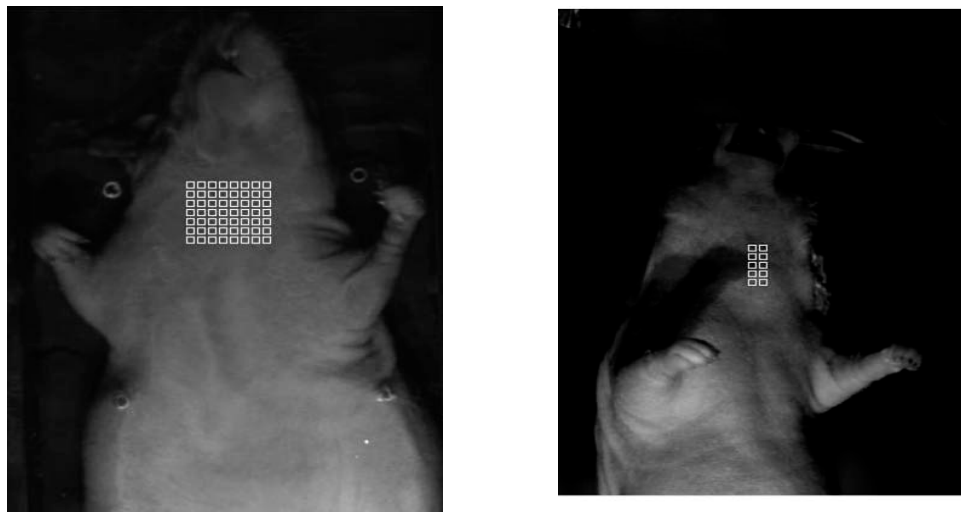
## 5.2.7 Experimentos adquisición placas paralelas vs adquisición en rotación.

### 5.2.7.1 Experimento ratón sin comprimir (E4) vs ratón comprimido (E5).

Con intención de comprobar ambas modalidades de adquisición se introdujo un capilar con 2  $\mu$ L del fluoróforo Alexa Fluor 680 en su punta en el esófago de un ratón ex-vivo, de manera análoga a como se hizo para el experimento E2 . Haciendo uso de la cama específica para la adquisición en modo de placas paralelas se realizó un experimento seleccionando 48 fuentes equiespaciadas sobre un área de 1cm x 1cm situadas en la parte anterior del torso del espécimen. Para la reconstrucción se seleccionaron 100 detectores.

El problema directo se planteo usando aproximación normalizada de Born . Debido a las fronteras planas, la matriz de pesos se calculó usando el método de las imágenes. Se reconstruyó la imagen usando 80 iteraciones del algoritmo ART, con un coeficiente de relajación de 1.5.

Posteriormente el sujeto se colocó en el portasujetos específico para la adquisición en modo varias proyecciones geométricas y se realizó un experimento con 15 proyecciones geométricas equiespaciadas angularmente, sobre cada una de las cuales se escogieron 12 fuentes situadas sobre un rectángulo de 0.6 x 0.2 cm tal y como se muestra en la *figura 5.14*



**Figura 5.14.** **Izquierda:** Imagen de luz blanca de referencia, para la adquisición en modo de placas paralelas (E2). Sobreimpuesta a ella las fuentes (cuadrados blancos). El láser incide en la parte anterior del sujeto. **Derecha:** Imagen de la luz blanca de referencia, para una de las posiciones de la adquisición en modo varias proyecciones geométricas (E3). Sobreimpuesta a ella se muestran las fuentes (cuadrados blancos). El láser incide en la parte anterior-lateral del sujeto.

### 5.2.7.2 Calibración del sistema para la adquisición en modo varias proyecciones geométricas (E4), extracción de la superficie y problema directo.

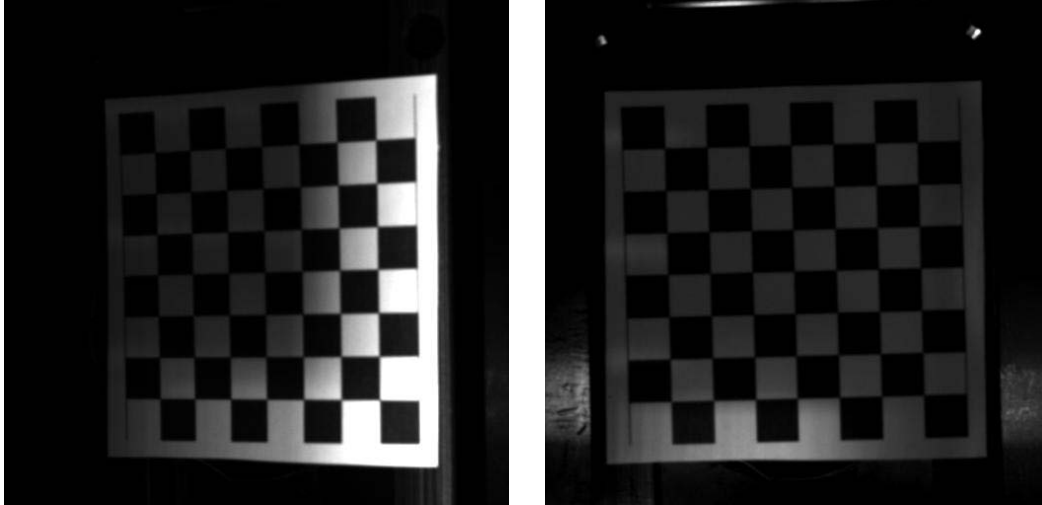
Es necesario realizar una calibración del sistema para encontrar las posiciones del chip CCD en cada proyección angular.

Para cualquier punto con coordenadas en un sistema de referencia del espacio real  $(x_w, y_w, z_w)$  y en el sistema de referencia de coordenadas de la cámara  $(u, v)$ , si se asume el modelo de cámara pinhole, se cumple la transformación

$$z_c \begin{bmatrix} u \\ v \\ 1 \end{bmatrix} = A \begin{bmatrix} R & T \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_w \\ y_w \\ z_w \\ 1 \end{bmatrix} \quad (3.10)$$

Donde R y T son matrices de rotación y traslación respectivamente. A es otra matriz que contiene los parámetros intrínsecos de la cámara (distancia focal, factores de escala y punto principal).

Para realizar el calibrado hemos utilizado la metodología clásica expuesta en [105], usando el TOOLBOX “camara calibration” del programa Matlab. Bajo esta metodología, se toman con la cámara CCD diferentes imágenes de luz blanca de un tablero de ajedrez, cuyos recuadros están en blanco negro, con la cámara en distintas posiciones y el propio tablero en distintas posiciones. A partir de la expresión (3.10) es posible calcular las posiciones de la cámara en el espacio [106].



**Figura 5.15.** Dos de las imágenes del tablero de ajedrez utilizadas para la calibración, cada una correspondiente a una posición diferente de la cámara CCD y del propio tablero.

La superficie fue extraída usando el método visual Hull [106], expuesto en [107], reconstruyéndola a partir de diferentes proyecciones del contorno del sujeto. Para ello se realizó una segmentación automática, tomando primero imágenes de fondo (cama sin el ratón) y posteriormente con el ratón [106]. En [68] y [69] se usan métodos similares para la extracción de superficie, obteniéndose las siluetas a partir de sombras. Una vez obtenida la superficie, el volumen se dividió en elementos finitos tetraédricos, aptos para su uso en el cálculo numérico de la solución del problema directo, usando el programa Amira.



**Figura 5.16.** **Izquierda:** Siluetas del sujeto para cada proyección angular. A partir de estas siluetas se reconstruye la superficie del sujeto. **Derecha:** Representación de la superficie del sujeto, se pueden apreciar los elementos finitos usados para el cálculo del problema directo.

El problema inverso se planteó usando aproximación normalizada de Born (ecuación 1.43). Para el cálculo de la matriz de pesos se utilizó el paquete informático de elementos finitos

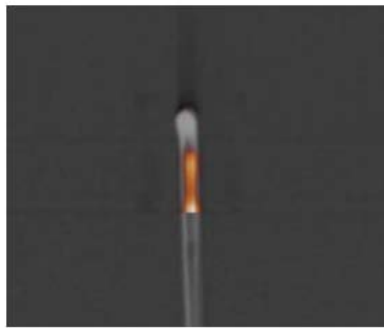
TOAST. Una vez calculada, se muestreo sobre una malla cúbica de 20x20x20 vóxeles, que engloba todo el volumen del ratón incluido en el FOV de los detectores. La imagen se reconstruyó usando 80 iteraciones del algoritmo ART, con un coeficiente de relajación de 1.5.

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Experimento con maniquí (E1) y con ratón (E2)

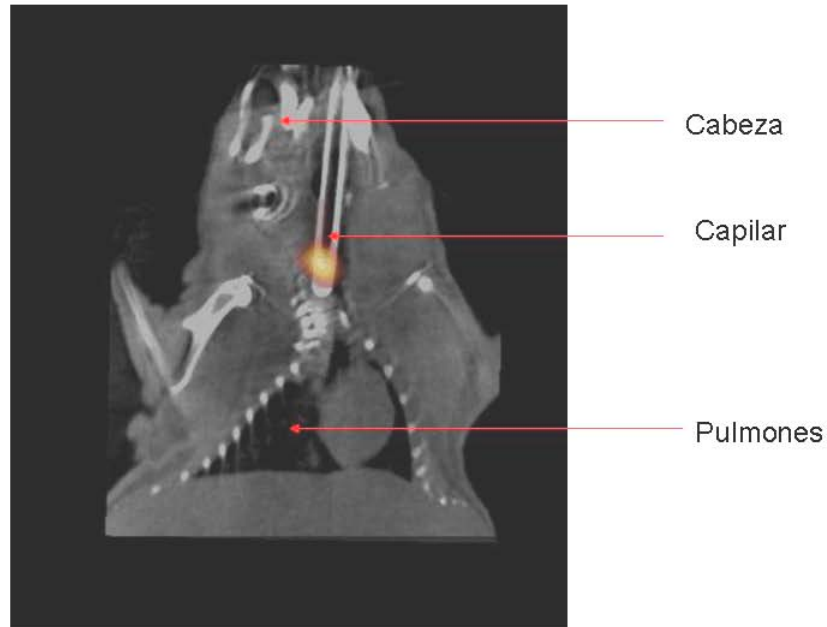
En la *figura 5.17* se muestra un corte coronal de las reconstrucciones CT y FDOT registradas y fusionadas del experimento correspondiente al maniquí (E1).

Debido a la posición superficial del capilar, ambas imágenes coinciden plenamente.



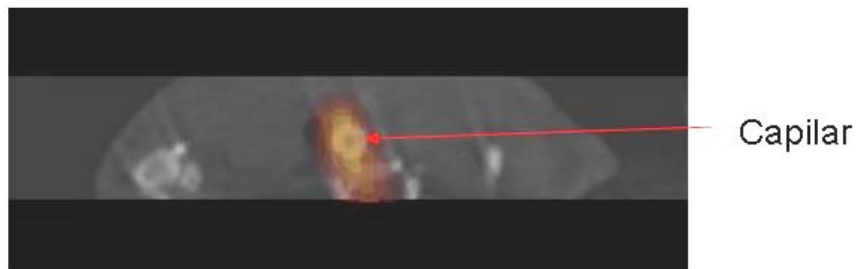
**Figura 5.17.** Corte coronal ( $z=1\text{mm}$ ) de la reconstrucción FDOT (escala de color) y CT (escala de grises). Ambas imágenes están registradas y fusionadas.

En la *figura 5.18* se observa un corte coronal reconstrucción CT y FDOT registradas y fusionadas del experimento correspondiente al ratón (E2). Se observa como la reconstrucción FDOT se ajusta a la zona de la punta del capilar. Debido a la profundidad y el consiguiente empeoramiento en la resolución, el ajuste es peor.



**Figura 5.18.** Corte coronal ( $z=5$  mm) de la reconstrucción FDOT (escala de color) y CT (escala de grises). Ambas imágenes están registradas y fusionadas.

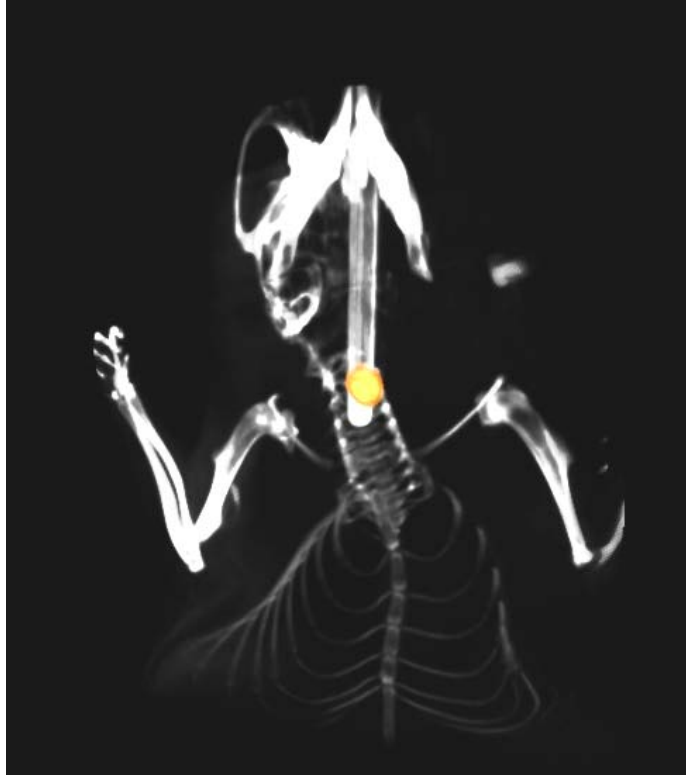
En la *figura 5.19* se observa un corte axial reconstrucción CT y FDOT registradas y fusionadas del experimento correspondiente al ratón (E2). Se observa perfectamente como la reconstrucción FDOT se ajusta a la zona de la punta del capilar. El empeoramiento en resolución es más evidente en el eje Z, debido a la configuración de placas paralelas.



**Figura 5.19.** Corte axial de la reconstrucción FDOT (escala de color) y CT (escala de grises). Ambas imágenes están registradas y fusionadas.

En la *figura 5.20* se muestra una representación tridimensional en perspectiva de ambas imágenes, ajustando el nivel de grises de la reconstrucción CT, para que aparezcan exclusivamente los huesos y el capilar.



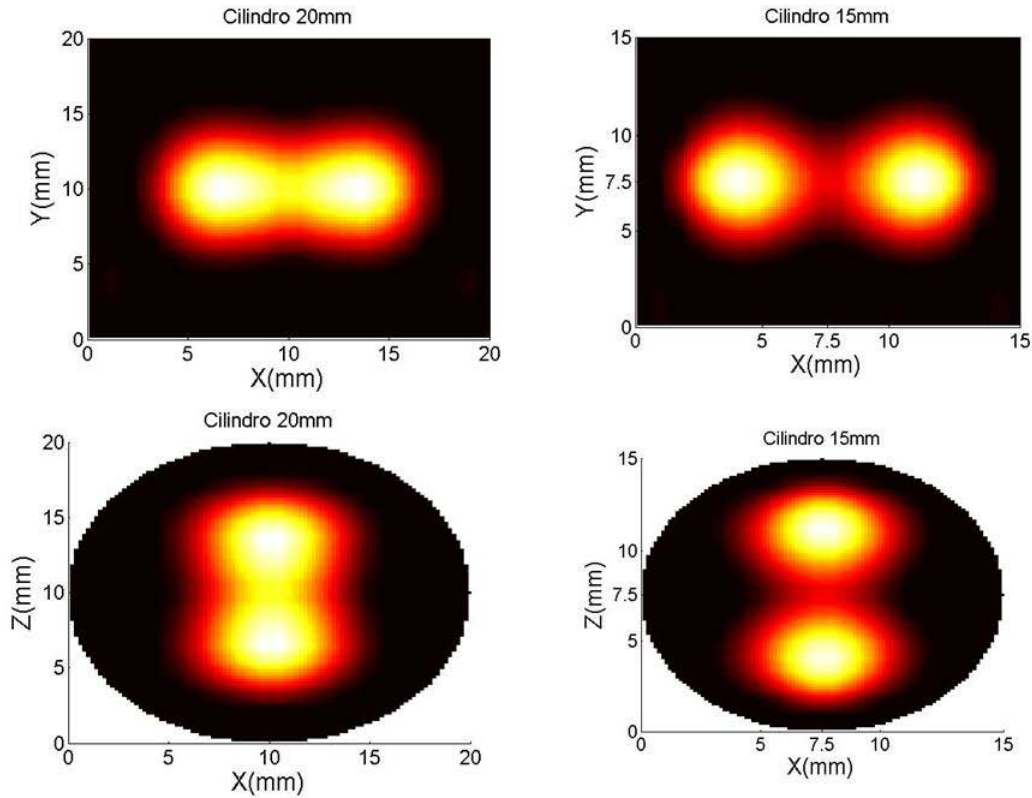


**Figura 5.20.** Corte axial de la reconstrucción FDOT (escala de color) y CT (escala de grises). Ambas imágenes están registradas y fusionadas.

### 5.3.3 Adquisición en rotación vs placas paralelas

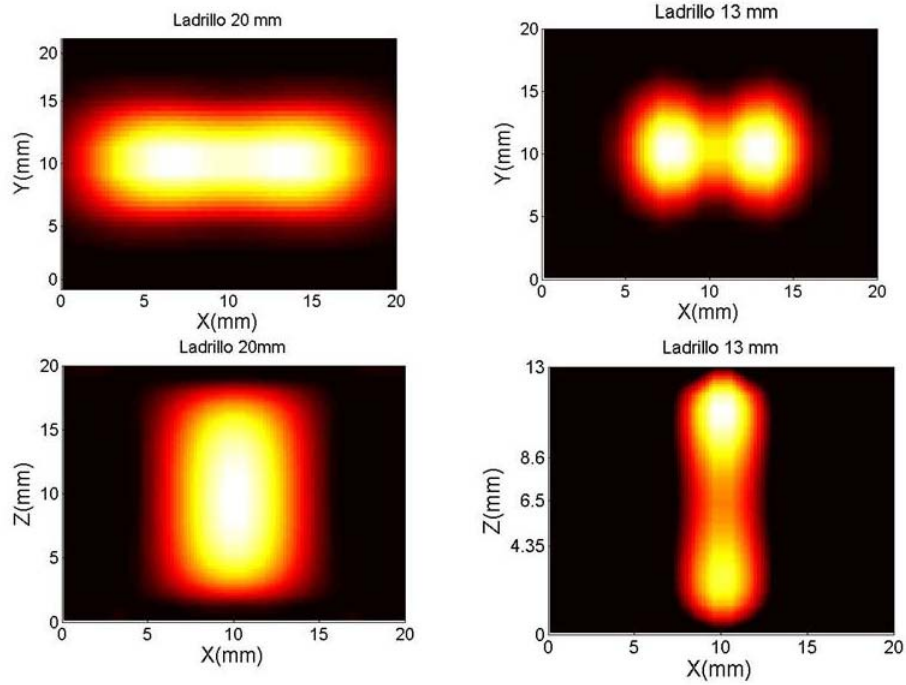
#### 5.3.3.1 Simulaciones

En la *figura 5.21* se pueden observar los cortes tomográficos correspondientes a las rodajas centrales de las reconstrucciones del cilindro (S1, S2, S3, S4). Se observa como al disminuir el diámetro las dos esferas aparecen separadas.



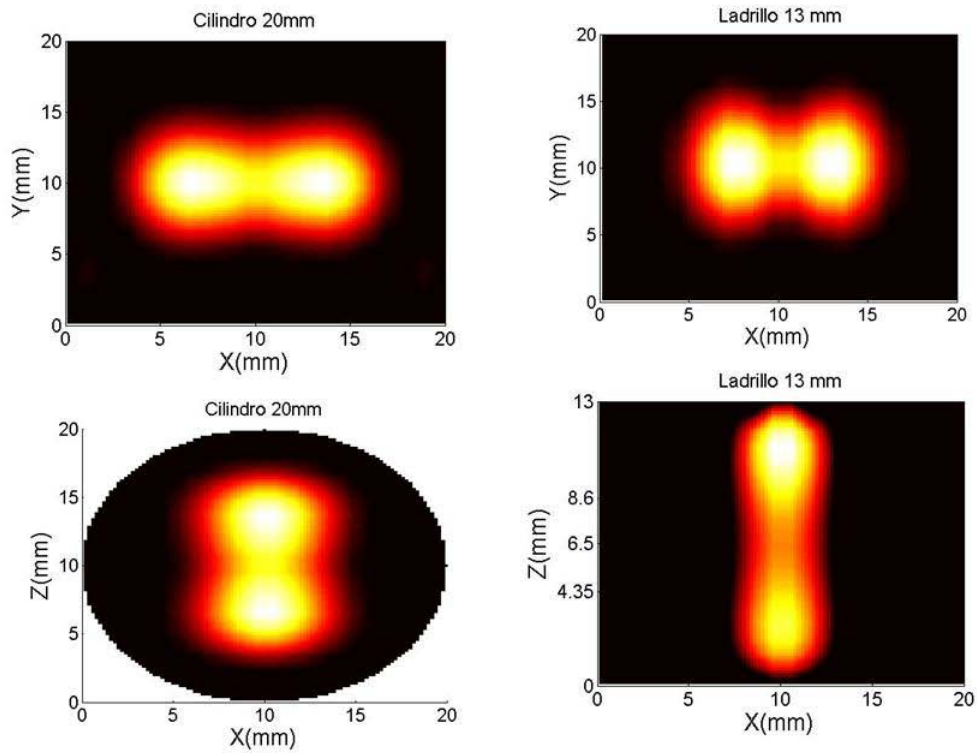
**Figura 5.21. Izquierda arriba (S1).** Corte coronal central ( $Z=0$ ) de la reconstrucción correspondiente al cilindro de 20 mm de diámetro, con las esferas fluorescentes situadas a lo largo de la dirección del eje X. **Derecha arriba (S3).** Corte coronal central ( $Z=0$ ) de la reconstrucción correspondiente al cilindro de 15 mm de diámetro, con las esferas fluorescentes situadas a lo largo de la dirección del eje X. **Izquierda abajo (S2).** Corte axial central ( $Y=0$ ) de la reconstrucción correspondiente al cilindro de 20 mm de diámetro, con las esferas fluorescentes situadas a lo largo de la dirección del eje Z. **Derecha abajo (S4).** Corte axial central ( $Y=0$ ) de la reconstrucción correspondiente al cilindro de 15 mm de diámetro, con las esferas fluorescentes situadas a lo largo de la dirección del eje Z.

El mismo efecto ocurre con las adquisiciones en modo de placas paralelas (S5, S6, S7, S8) (figura 5.22) .



**Figura 5.22. Izquierda arriba (S5).** Corte coronal central ( $Z=0$ ) de la reconstrucción correspondiente al ladrillo de 20 mm de altura, con las esferas fluorescentes situadas a lo largo de la dirección del eje X. **Derecha arriba(S7).** Corte coronal central ( $Z=0$ ) de la reconstrucción correspondiente al ladrillo de 13 mm de diámetro, con las esferas fluorescentes situadas a lo largo de la dirección del eje X. **Izquierda abajo (S6).** Corte axial central ( $Y=0$ ) de la reconstrucción correspondiente al ladrillo de 20 mm de altura, con las esferas fluorescentes situadas a lo largo de la dirección del eje Z. **Derecha abajo (S8).** Corte axial central ( $Y=0$ ) de la reconstrucción correspondiente al ladrillo de 13 mm de altura, con las esferas fluorescentes situadas a lo largo de la dirección del eje Z.

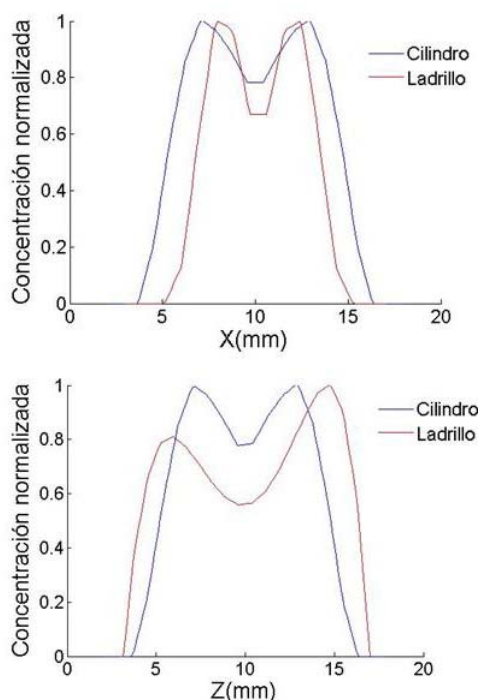
Una comparación visual de la adquisición del cilindro frente a la adquisición del ladrillo, para un mismo diámetro y altura similar (S1 vs S5, S2 vs S6, S3 vs S7 y S4 vs S8), muestra como la adquisición en placas paralelas resuelve peor las dos esferas. Este resultado es el “intuitivamente” esperado y está en acuerdo los obtenidos en [34]. Sin embargo, al comparar el cilindro con diámetro de 20 mm y el ladrillo de altura 13 mm (S1 vs S7 y S2 vs S8), se observa como la adquisición en modo placas paralelas iguala a la adquisición en rotación (*figura 5.23*), debido al efecto de la profundidad.



**Figura 5.23.** Rodajas centrales de la adquisición en rotación para el cilindro de 20 mm de diámetro cuando las esferas están alineadas en la dirección del eje X (izquierda arriba, S1) y en la dirección del eje Z (izquierda abajo S2). Rodajas centrales de la adquisición en palcas paralelas para el ladrillo de 13 mm de altura cuando las esferas están alineadas en la dirección del eje X (derecha arriba, S7) y en la dirección del eje Z (derecha abajo, S8)

El efecto se puede ver con más nitidez trazando los perfiles correspondientes a la recta  $y=10$  mm para las rodajas presentadas en la *figura 5.24 arriba* (S1 y S7) y los correspondientes a la recta  $x=10$  mm de la *figura 5.24 abajo* (S2 y S8)

Cilindro 20 mm diametro vs Ladrillo 13 mm altura



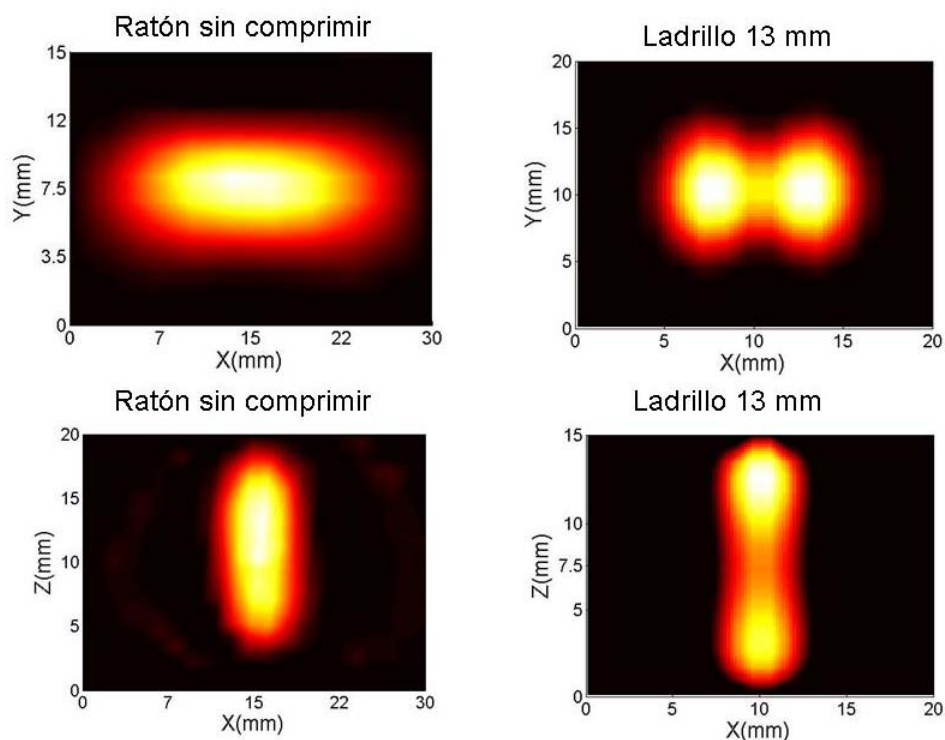
**Figura 5.24. Arriba.** Perfiles correspondiente a la recta  $y=10$  mm para las rodajas centrales de las simulación de la adquisición en rotación sin comprimir (S1) y la adquisición en placas paralelas comprimidas (S7), con las esferas fluorescentes situadas a lo largo del eje X. **Abajo.** Perfiles correspondiente a la recta  $x=10$  mm para las rodajas centrales de las simulación de la adquisición en rotación sin comprimir (S2), y la adquisición en placas paralelas comprimidas, con las esferas fluorescentes situadas a lo largo del eje Y (S8).

La relación pico valle para la adquisición en placas paralelas cuando las esferas tienen sus centros en el plano XY es de 1.49, mientras que para la adquisición modo rotatorio es de 1.28.

Cuando las esferas tienen sus centros situados en el plano XZ, la relación pico valle es de 1.28 para la rotación, y de 1.45 para el ladrillo (usando como valor máximo el del pico más bajo).

En la *figura 5.25* se pueden observar los cortes tomográficos correspondientes a las rodajas centrales de las reconstrucciones de la simulación de la adquisición en modo rotatorio, usando el atlas anatómico (S9,S10) y la adquisición en modo placas paralelas del ratón comprimido (S7,S8). Las esferas solo son distinguibles para la adquisición en placas paralelas.

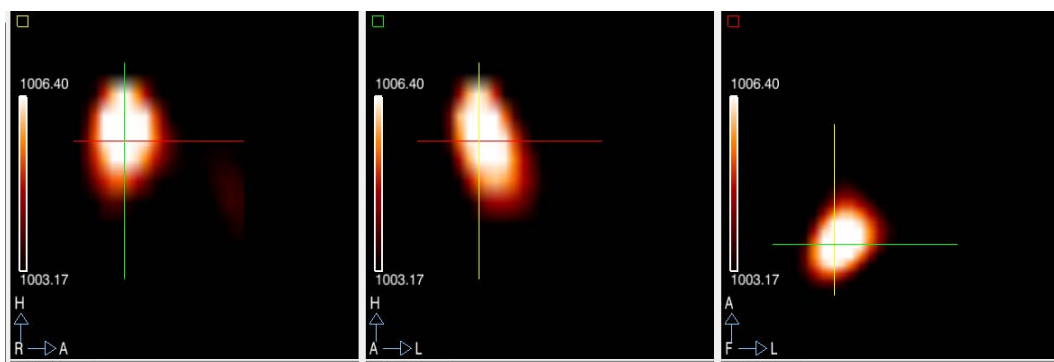
Debido a la anchura del ratón en su zona abdominal (28 mm), las reconstrucciones correspondientes a S9 y S10 son de peor calidad que sus “análogas cilíndricas” S1 y S2.



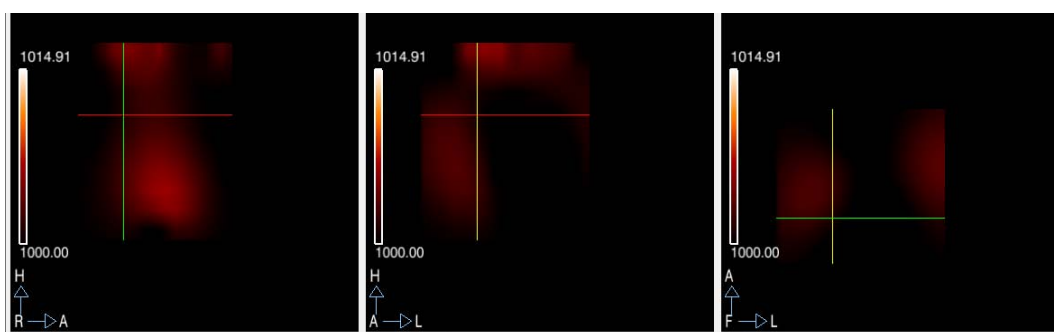
**Figura 5.25.** Rodajas centrales de la adquisición en rotación para el cilindro de 20 mm de diámetro cuando las esferas están alineadas en la dirección del eje X (izquierda arriba, S1) y en la dirección del eje Z (izquierda abajo S2). Rodajas centrales de la adquisición en palcas paralelas para el ladrillo de 13 mm de altura cuando las esferas están alineadas en la dirección del eje X (derecha arriba, S7) y en la dirección del eje Z (derecha abajo, S8)

### 5.3.3.2 Experimentos

En la *figura 5.25* se muestra la reconstrucción de la distribución de fluoróforo obtenido a partir de los datos del modo placas paralelas (E2), mientras que en la *figura 5.26* se muestra la reconstrucción equivalente para el modo de adquisición en rotación (E3). En el primer caso se distingue con nitidez la distribución fluorescente, mientras que en el segundo la imagen está dominada por ruido de baja frecuencia.



**Figura 5.25.** Cortes axial (izquierda), sagital (centro) y coronal (derecha), de la reconstrucción de la punta del capilar insertado el esófago de un ratón correspondiente a la adquisición en modo de placas paralelas.



**Figura 5.26.** Cortes axial (izquierda), sagital (centro) y coronal (derecha), de la reconstrucción de la punta del capilar insertado el esófago de un ratón correspondientes a la adquisición en modo varias proyecciones geométricas.

## 5.4 Discusión y conclusiones

Hemos construido una máquina híbrida FDOT/CT, obteniendo reconstrucciones registradas de CT y FDOT de maniqués y ratones. Estas imágenes permiten una interpretación más precisa de la información molecular y abren la puerta al uso de información a priori para la mejora del algoritmo de reconstrucción óptico.

Hemos comparado los modos de adquisición mediante simulaciones y experimentos.

Los resultados de las simulaciones, tanto en la comparación del cilindro con el ladrillo, como para la sonda distribuida en la zona del abdomen del ratón, muestran como el modo placas paralelas ofrece un rendimiento superior, debido a que si se comprime el ratón disminuye la profundidad de los fluoróforos, mejorando el planteamiento del problema tomográfico (ver sección 2.3).

En otros trabajos se han realizado estudios análogos [34]. Al igual que en ellos, obtenemos que la adquisición en rotación es superior a la de placas paralelas cuando el cilindro tiene un diámetro igual a la altura que el ladrillo. Sin embargo no contemplan la posibilidad de que el sujeto se comprima entre las placas.

Hemos realizado la misma comparativa utilizando datos obtenidos experimentalmente, para una sonda situada en el torso de un ratón. De nuevo la adquisición en placas paralelas ha ofrecido un mejor rendimiento. Sin embargo, no es posible afirmar con garantías que se deba a una mejora del planteamiento matemático general del problema. Para todas las proyecciones en la que la luz incide en la zona torso lateral del ratón, los datos poseen una relación señal a ruido baja, debido a la gran distancia en fuentes y detectores, impidiendo utilizar un 70 % de los pares detector fuente. Esta situación no se puede resolver aumentando el tiempo de exposición de la cámara o la potencia de láser, ya que la luz reflejada por el ratón en la zona incidente llega al detector, ocultando la señal de luz difusiva. Otros autores utilizan tecnología [108] de tubos foto multiplicadores, usando abertura cilíndricas como colimadores, que sólo permiten el paso de la luz de una región concreta del espacio y solventando aparentemente esta situación. Sin embargo, el número de pares de detector fuente se ve reducido.



## Capítulo 6

### 6. Aplicación de FDOT para la cuantificación de células T fluorescentes in-vivo.

*La técnica FDOT tiene el potencial para obtener la distribución tridimensional cuantitativa de sondas fluorescentes en animales pequeños in-vivo. Sin embargo, como hemos visto en la sección 2.3, son muchos los factores que operan en contra de la calidad de las imágenes reconstruidas. Debido a esto, si se pretende realizar estudios tomográficos cuantitativos, no basta con inyectar la sonda fluorescente en el sujeto a estudiar y lanzar la adquisición. Es necesario realizar un estudio experimental previo y así comprobar que para la pregunta biomédica que se quiere responder, se cumplen las condiciones necesarias bajo las que la FDOT proporciona imágenes fiables.*

*En este capítulo presentamos un estudio en el que demostramos que la técnica es capaz de cuantificar células T que expresan GFP, concretamente en los ganglios linfáticos y el timo de ratones transgénicos.*

#### 6.1 Introducción

El descubrimiento de las proteínas fluorescentes ha supuesto una revolución en la investigación biológica [3-4]. Mediante técnicas de ingeniería genética se puede controlar su expresión en organismos, permitiendo la visualización de procesos celulares, subcelulares y estructuras con gran contraste. El campo de la microscopía ha sufrido una transformación completa con la aparición de estas sondas, sin embargo la capacidad técnica para su visualización macroscópica, cuantitativa, no invasiva e in-vivo es limitada. De una parte el investigador dispone de la técnica fotográfica de imagen planar [5], que no proporcionan imágenes cuantitativas debido a las no linealidades del viaje fotónico a través de tejidos. Por otro lado, es posible acudir a la microscopia intravital [109], pero esta es una técnica muy invasiva, y solo es capaz de obtener información de la sonda a una micras de profundidad.

Por sus características la FDOT se postula como la técnica idónea para obtener la distribución

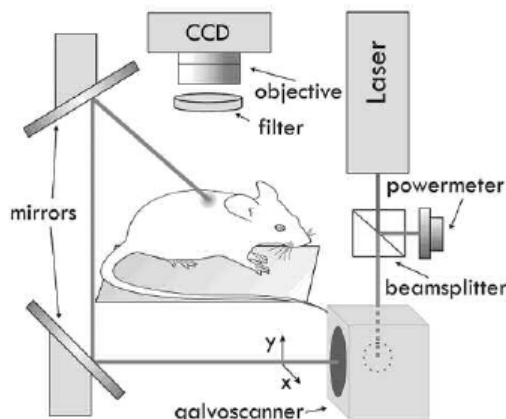
tridimensional de estas sondas in-vivo y de manera no invasiva. En [110] se demuestra por primera vez su capacidad para cuantificar estas sondas en ratones de laboratorio. Posteriormente en [37] se consigue hacer imagen tomográfica de células T expresando GFP, haciendo un estudio cuantitativo del bazo y el timo en cuatro sujetos.

Siguiendo la línea marcada por estos trabajos, hemos caracterizado la capacidad de un sistema FDOT desarrollo en el instituto FORTH [68] para cuantificar la cantidad de células T en los ganglios y el timo de 34 ratones transgénicos que expresan la proteína GFP+ regulada bajo de la región de control del locus hCD2 [111]. Tras la sesión de imagen, los animales eran sacrificados, extrayendo los ganglios y el timo, para contabilizar el número de células T usando citometría de flujo. Estos datos sirvieron de patrón áureo para la caracterización de la capacidad de cuantificación del sistema.

## 6.2 Materiales y métodos

### 6.2.1 Montaje experimental

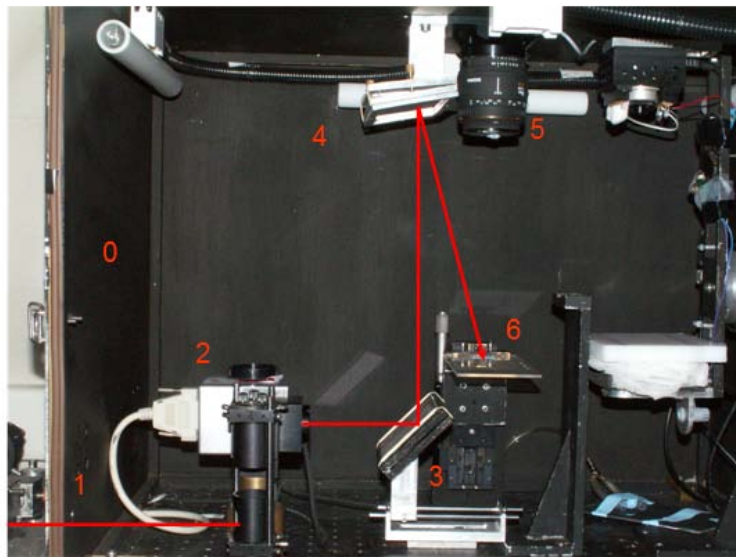
En el montaje utilizado para realizar los experimentos, el sujeto se sitúa en posición horizontal a una distancia fija de una cámara, que adquiere imágenes de 16 bits, mediante un chip CCD 1024x1024 pixeles, enfriada -70°C por un refrigerador Peltier (DV434, Andor Corp, Belfast, Northern Ireland). y su objetivo (50 mm y f/2.8 Sigma Corporation, Tokio, Japón). La línea de 488 nm de un láser de Argón (LaserPhysics, Reliant 1000m, West Jordan, UT) funcionando en modo de amplitud constante, se guía hasta el sujeto mediante espejos movidos por galvanómetros (Scancube 7, ScanLab AG, Puchheim, Alemania), produciendo un punto de 1mm de diámetro en el plano focal del objetivo de la cámara



**Figura. 6.1.** Esquema de la trayectoria que sigue el láser desde la fuente hasta el sujeto

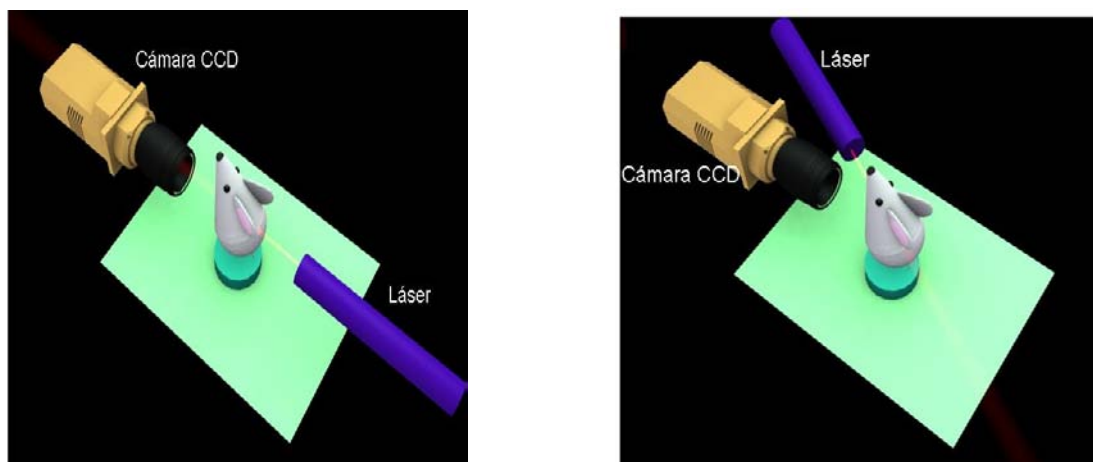
Para obtener las imágenes de excitación se usó un filtro óptico centrado en 488 nm de 60 nm de anchura y para las imágenes de fluorescencia se usó un filtro óptico centrado en 510 nm y 10 nm de anchura.

Todo el aparataje excepto el láser de argón estaba situado en el interior de una caja negra, con el fin de minimizar lo máximo posible las reflexiones indeseadas que contaminasen las imágenes adquiridas. El haz láser se introduce en la caja a través de un agujero practicado en un lateral. Durante su camino hacia el ScanCube, un 1% de la radiación es enviada mediante un divisor de haz a un medidor de potencia.



**Figura. 6.2.** Fotografía del montaje utilizado para los experimentos. La fuente láser se encuentra en el exterior de la caja negra (0). El haz colimado se introduce a través de un orificio practicado en un lateral (1) y es dirigido hasta el dispositivo scancube (2), dentro del cual se encuentran dos espejos movidos por galvanómetros que permiten escanear la muestra en los puntos deseados. El sujeto se coloca en la cama (6), los espejos (3) y (4) permiten que el láser llegue hasta él. Enroscado al objetivo de la cámara CCD (5) se sitúa el filtro óptico adecuado, para tomar las imágenes de excitación y de fluorescencia. El cambio de filtro se realiza manualmente.

Todas las imágenes se adquirieron en modo de reflexión. En esta situación el sujeto se coloca en posición supina, quedando su torso frente al objetivo de la cámara CCD. El láser incide en la zona donde se van adquirir los datos, de manera que se puede considerar que la medida de excitación está compuesta por los fotones difusivos reflejados por el sujeto. En el modo de transmisión, el láser incide en el sujeto en el perfil opuesto a la cámara CCD. En esta situación se puede entender que la medida de excitación está compuesta por los fotones difusivos transmitidos a través del sujeto.



**Figura. 6.3.** Esquema del montaje experimental de un experimento FDOT en modo de transmisión (izquierda) y modo de reflexión (derecha)

La adquisición de datos fue realizada con una computadora de 3.0 GHz con 512 MB RAM, controlada por un software programado ad-hoc usando el entorno *LabVIEW* (National Instruments, Austin, TX).

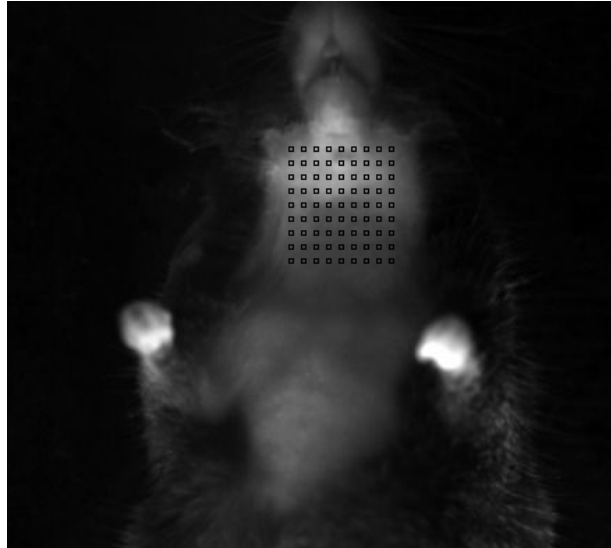
### 6.2.2 Manipulación de animales y adquisición de datos FDOT

Los experimentos fueron realizados usando ratones transgénicos que expresaban GFP en todas sus células T, regulada bajo la región de control del locus *hCD2* [111]. El constructo transgénico también está presente en las células B durante sus primeras fases de desarrollo, pero su expresión disminuye paulatinamente conforme las células se acercan a la maduración. No hay signos de expresión de GFP tanto en monocitos, como neutrófilos y eritrocitos [111], garantizando que la señal fluorescente proviene exclusivamente de la células T. Todos los ratones fueron criados en las condiciones de barrera recomendadas. Durante 10 generaciones los ratones fueron cruzados en modo “backcrossing”. Para el estudio se usaron ratones adultos ( $22.6 \pm 3.3$  g de peso) ( $n=34$ ) de ambos géneros (40% masculinos y 60 % femeninos).

Debido al denso pelaje negro de los ratones B10, la zona de interés de los sujetos fue afeitada usando crema depilatoria comercial (Nair). La crema permaneció en la zona no más de dos minutos y posteriormente se lavó con agua y una paleta. Tanto para el afeitado como para la adquisición de los datos los animales fueron ligeramente anestesiados con fluoretano al 2% mezclado con oxígeno al 100% usando un vaporizador (Lumic International). La mezcla se ajustó hasta conseguir una frecuencia respiratoria normal y evitar así movimientos debidos a

contracciones musculares. El gas anestésico llegaba a los sujetos tanto durante el afeitado como durante la adquisición mediante un tubo unido a la salida del vaporizador, unido en el otro extremo a una máscara que se ajustaba al hocico del animal.

Para lanzar la adquisición de datos el sujeto se sitúa en una plataforma fija. Usando el software de adquisición se escogían 81 fuentes situados en una malla rectangular de 9x9, cubriendo las áreas de interés en modo de reflexión. Típicamente se elegía un cuadrado de 1.1 x 1.3 cm para los ganglios linfático cervicales y 0.8 x 1.1 cm para el timo. La separación entre fuentes que resulta de estas distribuciones está en torno al recorrido libre medio de transporte de un fotón ~1mm, que es la distancia óptima entre fuentes, tal y como se ha probado en [30, 57]. Para todas las adquisiciones la potencia del láser se ajusto a 35 mW para la medida fluorescencia y 0.002 mW para la medida de excitación. Los tiempos de adquisición también se mantuvieron constantes durante todos los experimentos siendo de 0.05 tanto para fluorescencia como para excitación. Estas combinaciones de potencia y tiempos de adquisición, maximizaban el número de cuentas obtenidas en el chip CCD, sin llegar saturarlo. Todas las imágenes fueron normalizadas por los tiempos de adquisición y la potencia del láser.



**Figura. 6.4.** Imagen de luz blanca y sobreimpuestas las posiciones de la fuentes representadas por cuadrados negros.

### 6.2.3 Reconstrucción y cuantificación FDOT

Para cada imagen adquirida, se definieron 100 detectores cuadrados de 1mm x 1mm de área, equiespaciados sobre la región que ocupaban las fuentes. Tanto el tamaño de los detectores como

la distancia entre ellos cumplen con el criterio de optimización establecido en [30, 57]. Para cada detector se calculó la relación normalizada de Born [26], por lo tanto el problema directo se planteó usando la expresión (1.43). Los pesos de la matriz se calcularon usando la aproximación de difusión para un medio semi-infinito, suponiendo fronteras planas y el método de la frontera extrapolada (ecuación 1.32).

Para resolver el problema inverso se usaron diez iteraciones del algoritmo ART [81], con un coeficiente de relajación de 0.1, en concordancia con lo expuesto en la literatura [57].

Las imágenes reconstruidas se cuantificaron calculando el valor medio de los vóxeles de una región interés que contuviese a los órganos reconstruidos.

#### 6.2.4 Citometría de flujo

Tras realizar la adquisición FDOT los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajeron los órganos para medir el número de células T en los órganos usando FACS.

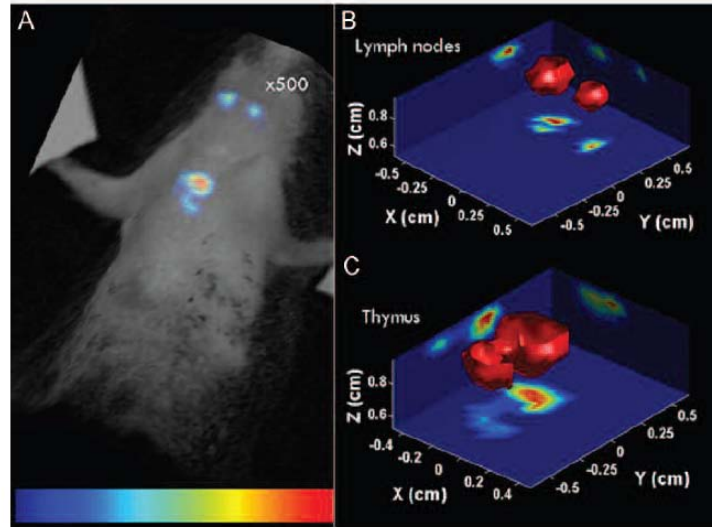
Las suspensiones celulares del timo y ganglios que se usaron para los análisis citométricos se obtuvieron realizando el siguiente procedimiento: los órganos se diseccionaron bajo un estereoscopio fluorescente y se disociaron usando un filtro de nylon de 40  $\mu\text{m}$ . Previamente habían sido introducidos en 5 mL de solución balanceada de Hank, suplementada con 10 nM Hepes y 5% de suero fetal bovino.

El porcentaje de células T fluorescentes fue medido en un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) y analizado con CellQuest software (BD Biosciences).

### 6.3 Resultados

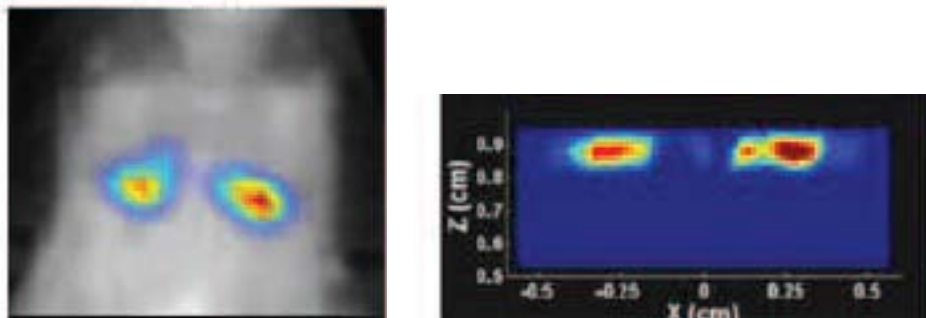
En la *figura 6.4 a)* se muestra una representación de los ganglios linfáticos y el timo, de los sujetos sobreimpuesta a la fotografía de luz blanca de referencia en la que se distingue perfectamente los dos ganglios linfáticos y el timo.

La reconstrucción FDOT de los ganglios se muestra en la *figura 6.4 b)* y del timo en la *figura 6.4 c)*



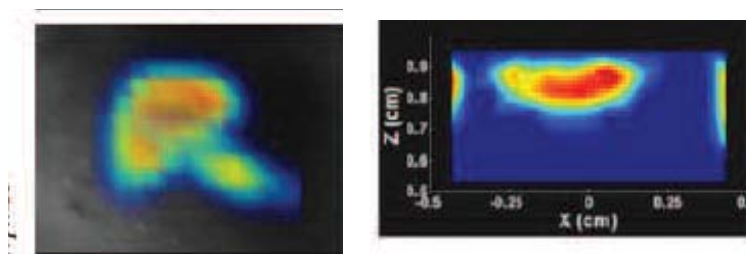
**Figura. 6.4.** a) Representación de la reconstrucción FDOT (escala de color, el azul representa intensidad baja, el rojo intensidad alta) sobreimpuesta a la imagen de luz blanca de referencia (escala de grises). Se distinguen con claridad el timo y los dos ganglios linfáticos cervicales b) Representación de la reconstrucción FDOT de la distribución de GFP en los ganglios linfáticos cervicales. c) Representación de la reconstrucción FDOT de la distribución de GFP en el timo.

En la *figura 6.5* se muestran un corte coronal y otro axial de otra reconstrucción representativa de los ganglios linfáticos.



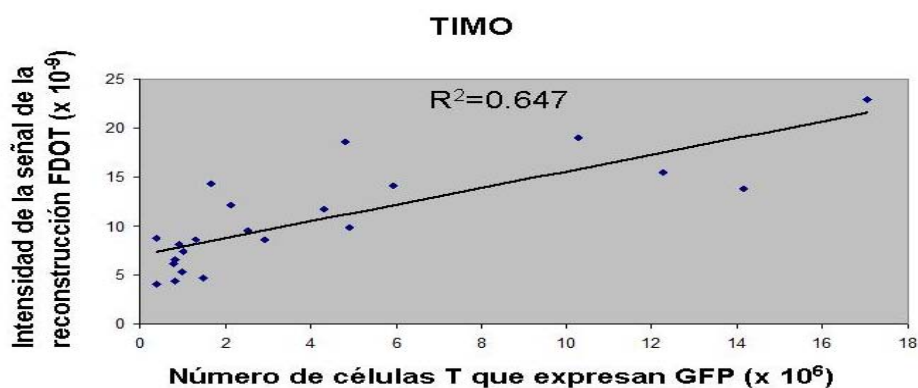
**Figura. 6.5.** Izquierda: Corte coronal de la reconstrucción FDOT ( $z=1$  mm) de los ganglios linfáticos (escala de color, el azul representa intensidad baja, el rojo intensidad alta), sobreimpuesta a la imagen de luz blanca (escala de grises) Derecha: Corte axial

En la *figura 6.6* se muestran un corte coronal y otro axial de otra reconstrucción representativa del timo.

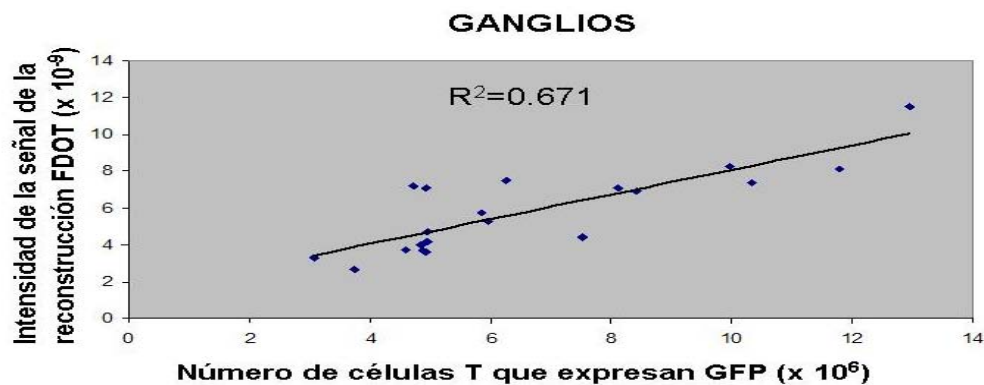


**Figura. 6.6.** Izquierda: Corte coronal de la reconstrucción FDOT ( $z=1$  mm) del timo (escala de color, el azul representa intensidad baja, el rojo intensidad alta), sobrepuesta a la imagen de luz blanca (escala de grises) Derecha: Corte axial

Las gráficas de la cuantificación FDOT y los cuantificación de citometría se muestran en las *figura 6.7* para el timo y en la *figura 6.8* para los ganglios. Un análisis de regresión lineal de los muestra una bondad del ajuste de  $R^2=0.65$ , y de  $R^2=0.67$  respectivamente.



**Figura. 6.7.** Representación gráfica del número de células T fluorescentes en el timo, obtenido mediante citometría de flujo (eje de abscisas), y los valores obtenidos en la reconstrucción FDOT (eje de ordenadas)



**Figura. 6.8.** Representación gráfica del número de células T fluorescentes en el timo, obtenido mediante citometría de flujo (eje de abscisas), y los valores obtenidos en la reconstrucción FDOT (eje de ordenadas)



## 6.4 Discusión y conclusiones

### 6.4.1 FDOT como instrumento cuantitativo

En este estudio hemos caracterizado la capacidad de la FDOT para cuantificar la cantidad de células T en los ganglios linfáticos y el timo de ratones transgénicos adultos, obteniendo una correlación significativa entre los datos proporcionados por la maquina y el patrón áureo. Estos resultados están en consonancia con los trabajos previos realizados acerca de la FDOT y su aplicabilidad a problemas de cuantificación que involucren proteínas fluorescentes [37, 110, 112]. Un punto clave para el éxito del trabajo es la fuerte especificidad de la sonda, siendo la concentración de fluorocromos muy elevada en los órganos linfáticos, y prácticamente nula en el resto de tejidos. La cercanía a la superficie de estos órganos es también determinante, ya para las longitudes de onda en las que opera la GFP, la longitud de penetración de la luz es del orden de 2 mm (ver sección 2.3).

### 6.4.2 El problema de la cuantificación interórgano.

A pesar de que la cuantificación intersujeto para el mismo órgano guarda relación con el patrón áureo, los resultados (*figuras 6.6 y 6.7*) muestran una incongruencia clara, la cuantificación interórgano es errónea. De acuerdo con los resultado de citometría, la cantidad de células T en el timo ( $\sim 10^8$ ) es un orden de magnitud mayor que en los ganglios ( $\sim 10^7$ ) y esto no lo reflejan los datos FDOT.

Hay varias hipótesis plausibles para explicar este hecho. Puede ser que debido a que la profundidad del timo es mayor con respecto a los ganglios, y a que capacidad de penetración de la luz en la longitud de onda de excitación y emisión de la GFP es muy baja, la contribución a las señal de fluorescencia se deba exclusivamente a la parte más superficial del timo, cuya consecuencia sería una cuantificación menor que la real.

Otra hipótesis razonable es la posible diferencia entre las propiedades ópticas del timo y los ganglios. Si fuesen lo suficientemente dispares, la asunción de homogeneidad induce a error, tal y como se ha demostrado en el capítulo 4. El uso de una máquina híbrida FDOT/CT es útil en este caso, adaptando los parámetros del CT para distinguir tejidos blandos.



## Capítulo 7

### 7. Conclusiones

En esta tesis doctoral se han estudiado diferentes aspectos de la técnica FDOT. A continuación se detallan las contribuciones más relevantes que se derivan de las investigaciones.

1-Hemos propuesto, diseñado y construido un maquina FDOT de no-contacto en geometría de placas paralelas y hemos evaluado su rendimiento. Los resultados demuestran su capacidad para realizar imagen de sondas fluorescentes en ratones, en acuerdo con la capacidad de otros sistemas publicados. Se ha desarrollado un software amigable tanto para realizar los experimentos, como para lanzar las reconstrucciones. El alto grado de automatización conseguido permite un uso sencillo de la máquina y del reconstructor.

2- Hemos descrito en detalle el comportamiento del algoritmo de reconstrucción ART, en función de sus parámetros y su influencia en la resolución y el contenido de ruido de las imágenes.

3-Hemos estudiado el efecto de las heterogeneidades de dispersión en la capacidad de cuantificación de FDOT, cuando se usan datos normalizados y se asumen propiedades ópticas constantes. Los resultados muestran que un coeficiente de dispersión heterogéneo provoca errores no depreciables de cuantificación. Modelar la heterogeneidad para el cálculo de la matriz de pesos consigue mejorar los errores, tanto en el caso de un maniquí con geometría simple como en una simulación de ratón teniendo en cuenta tres tipos de tejido.

4- Hemos propuesto, diseñado y construido una máquina híbrida FDOT/CT. La máquina se ha usado con éxito en maniqués y en ratón, obteniendo reconstrucciones ópticas y de rayos X registradas.

## **Conclusión**

Mediante simulaciones hemos mostrado que para una distribución fluorescente situada en el abdomen de un ratón, la adquisición en modo de placas paralelas ofrece mejores resultados que la adquisición en rotación, debido a que en la primera, se puede comprimir al sujeto, haciendo que los par detector-fuente estén más cercanos mejorando por tanto el planteamiento matemático general del problema.

5- Hemos medido la capacidad de un sistema FDOT para cuantificar in-vivo el número de células T en el timo y en los ganglios linfáticos cervicales en ratones transgénicos, encontrando relación lineal entre los datos proporcionados por FDOT frente a los datos obtenidos mediante citometría de flujo.

## Capítulo 8

### 8. Líneas Futuras

Los resultados presentados en este manuscrito en relación con la FDOT como técnica de imagen preclínica cuantitativa son prometedores. Sin embargo, lejos de zanjar ningún asunto, invitan a seguir investigando en diferentes líneas. A continuación se detallan las que creemos que son más relevantes.

- A pesar de la arquitectura compacta de la maquina FDOT de placas paralelas, hay espacio para muchas mejoras. Un revolver de láseres permitiría hacer imágenes de diferentes sondas simultáneamente. Ajustando el software de control del láser, se puede iluminar la muestra en modo frecuencia constante, pudiendo extender la funcionalidad del sistema no solo a FDOT si no también a DOT.

- La necesidad de modelar el coeficiente de dispersión abre una línea de investigación muy amplia, en la que es ineludible tratar de contestar a las siguientes preguntas: ¿Cuál es el coeficiente de dispersión de cada tejido? ¿Es posible obtener el coeficiente de dispersión de un sujeto a partir de su imagen de CT, MRI u otra técnica? Para un caso real, en el que hay múltiples tejidos con geometrías y coeficientes diversos, ¿un modelo completo realmente consigue mejorar la calidad de las imágenes?

Todas estas cuestiones se derivan de una única pregunta: ¿Con que precisión es capaz el esquema de la ecuación de transferencia radiativa de modelar el fenómeno del transporte fotónico a través de un sujeto vivo?

- La arquitectura del sistema FDOT/CT para la adquisición en rotación es mejorable, siendo imperativo buscar el método para discriminar la luz reflejada por el ratón de la señal, para las

### **Líneas futuras**

proyecciones en las cuales el camino recorrido por los fotones es mayor. De esta manera se mejorará el rendimiento de la adquisición en modo rotatorio. Es necesario realizar más experimentos y simulaciones para comprobar si la adquisición en placas paralelas sigue siendo superior a la rotatoria en otras regiones del ratón, como el torso o la cabeza.

- Se ha demostrado la capacidad de la técnica para medir la concentración de células T en los ganglios linfáticos cervicales y el timo; sin embargo, el estudio se debe ampliar, investigando si es posible hacer imagen de otros órganos linfáticos y encontrando el límite de detectabilidad.

Es necesario confirmar las causas del fallo de la cuantificación interórgano. Para ello hay que adaptar la maquina FDOT/CT para hacer imagen de rayos X de los ganglios cervicales y el timo y así usar su distribución espacial como información a priori en el problema directo. Para esto es imprescindible estudiar las propiedades ópticas de estos órganos.

## Apéndices

### **1) Tratamiento numérico de la ecuación de difusión fotónica mediante el método de los elementos finitos.**

Se pretende encontrar una solución aproximada de una ecuación en derivadas parciales, definida sobre un dominio  $\Omega$ , con frontera en  $\partial\Omega$ . Para comenzar se divide  $\Omega$  en elementos finitos que no se solapan, conformando una mallado. Los vértices de estos elementos son los nodos que se denotan como  $N_i (i=1...P)$  mientras que los elementos los denotamos como  $\tau_i (i=1...D)$ .

Suelen tener formas simples, como cubos, tetraedros o prismas.

Para resolver la ecuación de difusión fotónica (1.17) partimos de la ecuación de difusión con dependencia temporal

$$\frac{1}{c} \frac{\partial}{\partial t} U(r) - \nabla D(r) \nabla U(r) + \mu_a(r) U(r) = q(r_s) \quad (5.1)$$

Buscamos la solución de la expresión (5.1) en una región  $\Omega$ . Para ello multiplicamos ambos miembros de la ecuación por una función test, reagrupamos e integramos.

$$\int_{\Omega} \Psi(\vec{r}) \left[ \frac{1}{c} \frac{\partial}{\partial t} U(r) - \nabla D(r) \nabla + \mu_a(r) \right] U(r) - q_o(\vec{r}) d\Omega = 0 \quad (5.2)$$

Desarrollando la ecuación (5.2) integrando por partes obtenemos

$$\begin{aligned} \int_{\Omega} \Psi(\vec{r}) \frac{1}{c} \frac{\partial}{\partial t} U(\vec{r}, t) + D(\vec{r}) \nabla \Psi(\vec{r}) \nabla U(\vec{r}, t) + \mu_a(\vec{r}) \Psi(\vec{r}) U(\vec{r}, t) d\Omega = \\ = \int_{\Omega} \Psi(\vec{r}) q_o(\vec{r}, t) d\Omega + \int_{\partial\Omega} \Gamma(\vec{r}, t) \Psi(\vec{r}) d(\partial\Omega) \end{aligned} \quad (5.3)$$

En la formulación débil del problema, si  $\Psi$  pertenece al espacio de Sobolovev  $H^1(\Omega)$  (ella y su primera derivada son de cuadrado integrable en  $\Omega$ ), hallar la solución de (5.1) es equivalente a hallar  $U$  tal que la expresión (5.3) se cumpla para cualquier función  $\Psi$  perteneciente a  $H^1(\Omega)$ .

Para resolver (5.3) se expande  $U$  de la siguiente manera

$$\hat{U}(\vec{r}, t) = \sum_i^P U_i(t) \Psi_i(\vec{r}) \quad (5.4)$$

$\Psi_j$  es un set de funciones del subespacio  $\mathcal{U}^h$  que se define como el compuesto por las funciones continuas en  $\Omega$ , acotadas por su frontera ( $\partial\Omega$ ) y lineales en  $\tau_i$ . El soporte de  $\Psi_j$  son los elementos finitos que tienen el nodo  $N_j$  en alguno de sus vértices. La forma exacta de estas funciones dependerá de cómo sean los elementos finitos que les sirven de soporte.

El problema ahora consiste en hallar  $U$  tal que:

$$\begin{aligned} & \int_{\Omega} \Psi_j(\vec{r}) \frac{1}{c} \frac{\partial}{\partial t} U(\vec{r}, t) + D(\vec{r}) \nabla \Psi_j(\vec{r}) \nabla U(\vec{r}, t) + \mu_a(\vec{r}) \Psi_j(\vec{r}) U(\vec{r}, t) d\Omega = \\ & = \int_{\Omega} \Psi_j(\vec{r}) q_o(\vec{r}, t) d\Omega + \int_{\partial\Omega} \Gamma(\vec{r}, t) \Psi_j(\vec{r}) d(\partial\Omega) \\ & \forall \Psi_j : j = 1 \rightarrow P \end{aligned} \quad (5.5)$$

La expresión (5.5) se puede escribir en notación matricial como:

$$B \frac{\partial \vec{U}}{\partial t} + (K(D) + C(\mu)) \vec{U} = \vec{Q} + \vec{\beta} \quad (5.6)$$

$$\begin{aligned} B_{ij} &= \frac{1}{c} \int_{\Omega} \Psi_j(\vec{r}) \Psi_i(\vec{r}) d\Omega \\ K_{ij} &= \int_{\Omega} D(\vec{r}) \nabla \Psi_j(\vec{r}) \nabla \Psi_i(\vec{r}) d\Omega \\ C_{ij} &= \int_{\Omega} \mu(\vec{r}) \Psi_j(\vec{r}) \Psi_i(\vec{r}) d\Omega \\ Q_j(t) &= \int_{\Omega} \psi_j(\vec{r}) q_o(\vec{r}, t) d\Omega \\ \beta_j(t) &= \int_{\Omega} \psi_j(\vec{r}) \Gamma(\vec{r}, t) d(\partial\Omega) \end{aligned} \quad (5.7)$$



Debido a que cada  $\Psi_j$  tienen un soporte muy acotado, la mayoría de los términos de las matrices de la expresión (5.7) serán cero, siendo matrices definidas dispersas.

En el caso relevante para FDOT, la dependencia temporal de la ecuación (5.1) es cero por lo que (5.6) es un sistema de ecuaciones lineales, cuya solución es la densidad fotónica en los nodos de la malla. Mediante interpolación se halla la densidad fotónica en el resto del dominio.

## ***2) Descomposición en valores singulares, regularización de Tikhonov y análisis de valores singulares.***

El problema tomográfico de FDOT consiste en resolver el siguiente sistema de ecuaciones

$$Wf = d \quad (5.8)$$

Donde  $d$  es el vector que contiene las medidas,  $W$  es la matriz de pesos y  $f$  es el vector de incógnitas. El problema consiste en hallar  $f$  tal que

$$\min_f \|Wf - d\|_2 \quad (5.9)$$

Una estrategia común para hallar la solución es hacer la descomposición en valores singulares de la matriz  $W$ , expresándola como

$$W = U\Sigma V^T \quad (5.10)$$

Donde  $U$  y  $V$  son matrices ortonormales de  $M \times M$  y  $N \times N$  respectivamente, que contienen los autovectores de  $W$  y  $\Sigma$  es una matriz diagonal de  $M \times N$  que contiene los valores singulares ( $\sigma_i$ ) de  $W$ . Esta expresión permite invertir  $W$  pudiéndose hallar la solución de la ecuación (5.8) a partir de la expresión analítica

$$f = \sum_{i=1}^{rang(W)} \frac{u_i^T d}{\sigma_i} v_i \quad (5.11)$$

Debido a que el problema esta insertado en el grupo de problemas mal condicionados, los autovalores caen gradualmente a cero. Esto hace que una pequeña variación en el vector de datos  $d$  provoque una gran variación en el vector de soluciones  $f$ , y el sistema es por tanto inestable. La regularización consigue solventar este problema filtrando las contribuciones de los autovalores más pequeños. Concretamente la regularización de Tikhonov modifica (5.11) convirtiéndola en

$$f_{\lambda} = \sum_{i=1}^{rang(W)} \frac{u_i^T \sigma_i d}{\sigma_i^2 + \lambda \sigma_0^2} v_i \quad (5.12)$$

donde  $\lambda > 0$  es el parámetro de regularización y  $\sigma_0$  el valor singular mayor. Todos los autovalores menores que  $\lambda$  se filtran, pudiéndose discriminar entre valores singulares útiles y no útiles. Para calcular  $\lambda$  se utilizan métodos automáticos como la L curva, la U curva, o empíricos. Formulando el problema en términos de mínimos cuadrados, la ecuación (5.12) se deriva de la siguiente expresión

$$\min_f \left\{ \|Wf - d\|^2 + \lambda \|f\|^2 \right\} \quad (5.13)$$

Usando (5.10) podemos escribir (5.8) como

$$U^T d = \Sigma V^T f \quad (5.14)$$

Desde esta perspectiva, las columnas de  $U$  se pueden entender como el espacio de detección de  $W$ , mientras que las columnas de  $V$  se puede entender como el espacio de la imagen de  $W$ . Ambos espacios están acoplados por la matriz de los valores singulares de  $W$ . Por lo tanto, el número de valores singulares útiles es una medida que sirve como referencia para comparar la idoneidad de dos modos de adquisición con diferentes parámetros (distribución de fuentes, distribución de detectores, nº de proyecciones geométricas, etc)

### 3) Usos de la información a priori en el problema inverso

De un punto de vista probabilístico el problema inverso se puede enunciar a partir del teorema de Bayes

$$p(x|y) = \frac{p(y|x)p(x)}{p(y)} \quad (5.15)$$

donde  $x$  e  $y$  son los vectores que contienen la imagen reconstruida y los datos adquiridos respectivamente. El término  $p(x|y)$  es la probabilidad de que una imagen reconstruida se obtenga dados unos datos. Por tanto hallar la imagen que maximiza  $p(x|y)$  es resolver el problema inverso. Usando una argumentación análoga, el término  $p(y|x)$  representa el problema directo y  $p(x)$  es la distribución de probabilidad que representa la información a priori.

Suponiendo que  $x$  tiene dimensión  $n$  (vóxeles), y cada uno de ellos sigue una distribución gaussiana,  $x$  sigue una distribución gaussiana multivariable centrada en una media  $x_p$  y matriz de covarianza  $C$

Entonces

$$p(x) = \frac{1}{(2\pi)^{n/2} (\det(C^{-1}))^{1/2}} e^{-\frac{1}{2} \|x - x_p\|_{C^{-1}}^2} \quad (5.16)$$

Por otro lado los datos adquiridos cumplen

$$y = Wx + \eta \quad (5.17)$$

Donde  $W$  es la matriz de pesos y  $\eta$  ruido. Suponiendo  $\eta$  es ruido gaussiano de media cero con matriz de covarianza  $B$  entonces

$$p(y|x) = \frac{1}{(2\pi)^{m/2} (\det(B^{-1}))^{1/2}} e^{-\frac{1}{2} \|y - Wx\|_{B^{-1}}^2} \quad (5.18)$$

Y la expresión (5.15) se convierte en

$$p(x|y) = \frac{1}{p(y)} e^{(-\frac{1}{2}\|Wx-y\|_0^2) + (-\frac{1}{2}\|x-x_p\|_p^2)} \quad (5.19)$$

Si suponemos los vóxeles de la imagen no están correlacionados y el ruido también, la matrices de covarianza se convierten en la matriz unidad, y maximizar  $p(x/y)$  es equivalente a resolver el problema de optimización

$$\min_f \left\{ \|Wx - y\|_2^2 + \lambda \|x\|_2^2 \right\} \quad (5.20)$$

El segundo término es la expresión de la regularización de Tikhonov.

En general, cualquier asunción a priori sobre la imagen reconstruida conduce a la expresión

$$\min_f \left\{ \|Wx - y\|_2^2 + Q(x) \right\} \quad (5.21)$$

donde  $Q(x)$  es una función que depende de cómo sea la información a priori que se supone inherente a  $x$ .

A modo de ejemplo, algunos autores utilizan información estructural a priori, suponiendo que los vóxeles asociados a determinadas regiones del espacio están correlacionados siendo la matriz de covarianza  $C = \lambda^{-2} (L^T L)^\dagger$ . En este caso  $Q(x) = \lambda^2 \|Lx\|^2$ .

Otro a priori comúnmente utilizado consiste en suponer que  $p(x) \propto \exp(-\|\nabla x\|)$ , haciendo  $Q(x) = \lambda \|\nabla x\|$ . De este modo la variación total se minimiza y el reconstructor tiende a suprimir el ruido de alta frecuencia, preservando los bordes de la imagen.

#### **4) Registro de imágenes mediante SVD.**

Se parte de dos imágenes sobre las se han elegido un conjuntos de puntos ( $\{p_1, p_2, p_3\}$  para la imagen 1 y  $\{p'_1, p'_2, p'_3\}$  para la imagen 2) que se supone ocupan las mismas coordenadas en el espacio real.

El problema consiste en encontrar la traslación y la rotación que cumplen

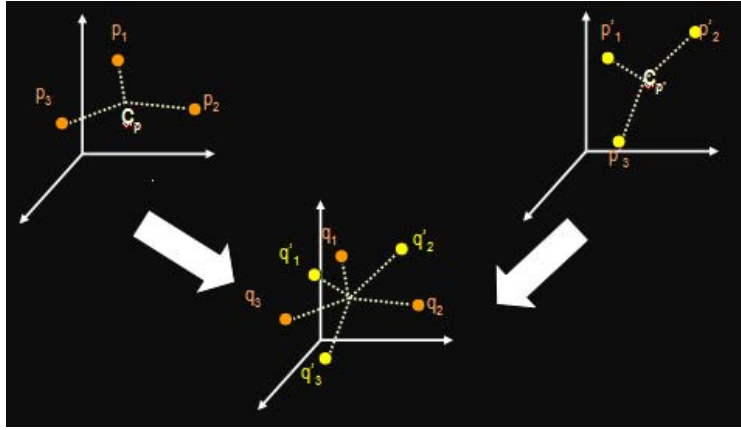
$$p'_i = Rp_i + T \quad (5.22)$$

Donde  $p_i$  y  $p'_i$  son matrices columna  $3 \times 1$ ,  $R$  es una matriz de rotación  $3 \times 3$ ,  $T$  es un vector de translación (matriz  $3 \times 1$ ). Se quiere encontrar  $R$  y  $T$  que minimizan la siguiente expresión

$$\Sigma^2 = \sum_{i=1}^N \|p'_i - (Rp_i + T)\|^2 \quad (5.23)$$

El algoritmo de registro se inicia calculando los centros de masas de ambos conjuntos de puntos y trasladando uno sobre el otro, quedando definidas dos nuevos conjuntos de puntos  $\{q_1, q_2, q_3\}$

$$\{q'_1, q'_2, q'_3\}$$



**Figura 7.1 Arriba izquierda y derecha:** Representación de los dos conjuntos de puntos que se quieren registrar, y sus centros de masas  $\{p_1, p_2, p_3\}$  y  $C_p$ ,  $\{p'_1, p'_2, p'_3\}$  y  $C_{p'}$ . **Abajo:** Nuevos conjuntos de puntos  $\{q_1, q_2, q_3\}$   $\{q'_1, q'_2, q'_3\}$  tras la unión de los centros de masas.

Ahora resta encontrar la rotación que minimice:

$$\Sigma^2 = \sum_{i=1}^N \|q'_i - Rq_i\|^2 \quad (5.24)$$

Si se define la matriz  $H$  como

$$H = \sum_{i=1}^N q_i q_i^T \quad (5.25)$$

y se calcula su descomposición en valores singulares

$$H = U\Sigma V^T \quad (5.26)$$

Se demuestra en que el problema de mínimos cuadrados se resuelve para

$$R = VU^T \quad (5.27)$$

## **5) Programas de adquisición y reconstrucción**

Se han programado herramientas informáticas de fácil uso para dirigir la adquisición y reconstrucción del FDOT en placas paralelas y el FDOT incluido en el escáner CT. A continuación las describimos.

### **5.1 Programas de adquisición**

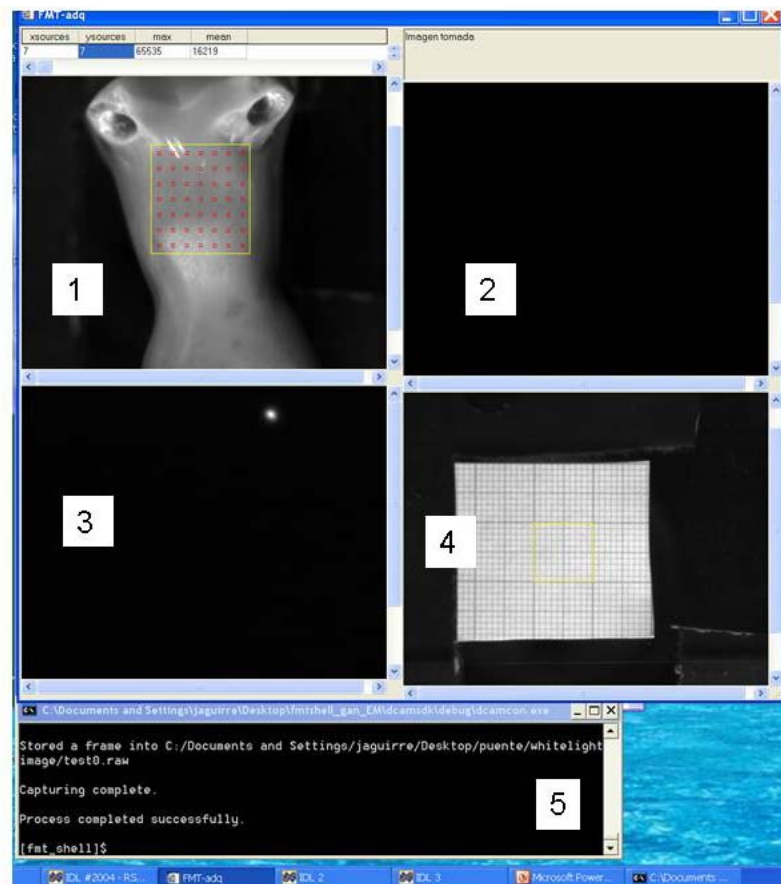
En el FDOT de placas paralelas, el control de la cámara CCD, la rueda de filtros, y galvanómetros está programado en código C, lanzándose las instrucciones en línea de comandos. Un interfaz de visualización programado en IDL permite el seguimiento en tiempo real del experimento (*figura 7.2*)

Previo a la realización de una adquisición es necesario calibrar el aparato. El comando “CALIBRAR” lanza el proceso, que es completamente automático. El láser incide en diferentes puntos de una pantalla difusora. A partir de estas imágenes el programa calcula automáticamente la relación entre el sistema de referencia del scancube y el de la cámara, hallando el número micropasos de los galvanómetros del de los espejos hacer falta para que el láser recorra la distancia equivalente a un pixel de la CCD.

Una vez se ha insertado el portasujetos en la plataforma, la instrucción “GO” lanza la adquisición. El software indica al usuario que seleccione el directorio de trabajo y se adquiere la imagen de luz blanca de referencia, sobre la cual se posiciona manualmente el número de fuentes que se desea. A partir de este momento la adquisición es completamente automática siguiendo los pasos explicados en la sección 3.2.1.

Una vez acabado el experimento se generan siete archivos que contienen los datos crudos y los parámetros de la adquisición: las imágenes de fluorescencia y de excitación se guardan en 2 pilas TIFF. Las posiciones de la fuentes, resultados de la calibración y tiempos de adquisición se

guardan dos archivos con la extensión .IIG (uno para excitación y otro para fluorescencia), en formato ASCII. La imagen de luz de blanca se guarda en formato TIFF, así como las imágenes del ruido de fondo correspondientes a la adquisición de los datos de fluorescencia y de excitación.



**Figura 7.2.** Impresión de pantalla del software de adquisición. 1,2,3,y 4 corresponden al visor programado en IDL, mientras que 5 es la línea de comandos. En 1 se observa la imagen de luz blanca y se escogen las fuentes (cuadrados rojos). Una vez lanzado el experimento en 2 se ve las imágenes adquiridas en tiempo real. 3 y 4 sirven para visualizar y controlar el calibrado.

Para la adquisición en modo rotatorio se modificó ligeramente el programa del FDOT en placas paralelas. Valiéndonos de los programas previos desarrollados para CT, el gantry se coloca en la posición angular. El comando “GO” lanza la adquisición tal y como se ha descrito al comienzo de esta sección, con la particularidad de que la posición angular queda grabada, para la reconstrucción posterior.

## 5.2 Programa de reconstrucción

Para el FDOT en placas paralelas se ha programado el algoritmo de reconstrucción ART en código C y se invoca en una pequeña interfaz de usuario programada en IDL (figura 7.3). A través de la pestaña FILE se elige la carpeta donde se encuentran los archivos generados por el software de adquisición. El programa procesa los datos, sustrayéndoles el ruido y normalizando por el tiempo de exposición y la potencia del láser y hace aparecer la imagen de referencia de luz blanca en el interfaz. Sobre esta imagen el usuario posiciona manualmente el número de detectores, elegir el volumen sobre el que se quiere reconstruir, y define los diferentes parámetros de reconstrucción (número de vóxeles, número de iteraciones, parámetro de relajación,  $\mu_a$  y  $\mu'_s$ ). Finalmente la pestaña RUN invoca el reconstructor. La imagen reconstruida se guarda en formato .raw.



**Figura 7.3.** Impresión de pantalla en la que se observa el programa de reconstrucción. Sobre la imagen de luz blanca se elige la zona sobre la que se quiere reconstruir (cuadrado rojo) y la posición de los detectores (cuadrados amarillos). Usando las diferentes pestañas se pueden escoger los diferentes parámetros de reconstrucción.



## Publicaciones derivadas del trabajo de la Tesis

### Artículos publicados en revistas internacionales

- **J Aguirre**<sup>††</sup>, J F P-J Abascal, I, J Chamorro-Servent, M Schweiger, S Arridge, J Ripoll, J J Vaquero, M Desco. "*Influence of Scattering on the Quantification of Fluorescence Diffuse Optical Tomography using Normalized Data*" Journal of Biomedical Optics. In press

-J Chamorro, **J Aguirre**, J Ripoll, JJ Vaquero, M Desco. "*Feasibility of U-curve Method to Select the Regularization parameter for Fluorescence Diffuse Optical Tomography in Phantom and Small Animal Studies*". Opt Express, 11490-11506, 2011.

-A Martin , **J Aguirre** ,A Sarasa-Renedo , D Tsoukatou , A Garofalakis, H Meyer , C Mamalaki , J Ripoll ,AM Planas. "*Imaging changes in lymphoid organs in vivo after brain ischemia with three-dimensional fluorescence molecular tomography in transgenic mice expressing green fluorescent protein in T lymphocytes.*" Mol Imaging. 2008 Jul-Aug;7(4):157-67.

- T Correia, **J Aguirre**, A Sisniega, J Chamorro, J Abascal, JJ Vaquero, M Desco, V Kolehmainen, and S Arridge "A split operator method for fluorescence diffuse optical tomography using anisotropic diffusion regularisation with prior anatomical information" J Biomed Opt Express Vol. 2, Iss. 9, pp. 2632–2648 (2011).

- J Abascal, J Chamorro-Servent, **J Aguirre**, Arridge, T Correia, J Ripoll, J J Vaquero, M Desco. "*Fluorescence Diffuse Optical Tomography using the Split Bregman Method*". Med. Phys. 38, 6275 (2011).

### Artículos en actas de congresos

- **J Aguirre**, J Chamorro-Servent, J Abascal, J Ripoll, M Desco, JJ Vaquero. "*Imaging features of an FDOT system with optimized ART parameters*". Libro de actas del XXVIII Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica (CASEIB), 155, 2010

- **J Aguirre**, J Ripoll, P Guerra, JJ Vaquero, M Desco. "*Nuevo modelo para describir el transporte de luz proveniente de un láser en medios biológicos*". Actas del XXVII Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica, 353-356, 2009.

- **J Aguirre**, M Abella, J Ripoll, JJ Vaquero, M Desco. "*OSEM reconstruction algorithm for fluorescence molecular tomography: a preliminary study*". Int J CARS, 3(Suppl 1): S15-S16, 2008

---

<sup>††</sup> Los dos primeros autores realizaron una contribución equivalente al documento.

- **J Aguirre**, A Sisniega, J Ripoll, M Desco, JJ Vaquero. *"Diseño y desarrollo de un sistema híbrido de Tomografía de Fluorescencia Molecular y CT"*. Libro de Actas del CASEIB 2008, 329-331, 2008.
- **J Aguirre**, A Sisniega, J Ripoll, M Desco, JJ Vaquero. *"Design and development of a co-planar fluorescence and X-ray tomograph"*. 2008 IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record, 5412-5413, 2008.
- **J Aguirre**, J Ripoll Lorenzo, JJ Vaquero López, M Desco Menéndez. *"Desarrollo de un sistema de Tomografía de fluorescencia molecular, FMT"*. Actas del XXV Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica, 21-23, 2007.
- **J Aguirre**, A Sisniega, J Ripoll, M Desco, JJ Vaquero. *"Co-Planar FMT-CT"*. Online Abstract of 2008 World Molecular Imaging Congress (WMIC), 333, 2008
- J Chamorro-Servent, J Abascal, **J Aguirre**, SR Arridge, J Ripoll, JJ Vaquero, M Desco. *"Optimización del diseño experimental FDOT de órganos de animal pequeño a través del análisis de valores singulares"*. Libro de actas del XXVIII Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica (CASEIB), 160, 2010
- P Guerra, **J Aguirre**, JE Ortuño, MJ Ledesma, JJ Vaquero, M Desco, J Ripoll, A Santos. *"Simulador Monte Carlo para el estudio de la propagación de la luz en el tejido"*. Actas del XXVII Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica, 275-278, 2009.
- J Chamorro-Servent, **J Aguirre**, J Ripoll, JJ Vaquero, M Desco. *"Optimización del diseño experimental y reconstrucción FDOT a través del análisis de valores singulares"*. Actas del XXVII Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica, 173-176, 2009.
- J Chamorro-Servent, **J Aguirre**, J Ripoll, JJ Vaquero, M Desco. *"FDOT Reconstruction and Setting Optimization using Singular Value Analysis with Automatic Thresholding"*. 2009 IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record, 2827-2829, 2009.
- P Guerra, **J Aguirre**, JE Ortuño, MJ Ledesma-Carbayo, JJ Vaquero, M Desco, A Santos. *"Multipurpose Monte Carlo simulator for photon transport in turbid media"*. 2009 IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record, 3845-3848, 2009.

## Bibliografía

1. Pomper, M.G., *Molecular imaging: an overview*. Acad Radiol, 2001. **8**(11): p. 1141-53.
2. Weissleder, R. and U. Mahmood, *Molecular imaging*. Radiology, 2001. **219**(2): p. 316-33.
3. Giepmans, B.N., et al., *The fluorescent toolbox for assessing protein location and function*. Science, 2006. **312**(5771): p. 217-24.
4. Weissleder, R. and M.J. Pittet, *Imaging in the era of molecular oncology*. Nature, 2008. **452**(7187): p. 580-9.
5. Ntziachristos, V., et al., *Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(3): p. 313-20.
6. Weissleder, R. and V. Ntziachristos, *Shedding light onto live molecular targets*. Nat Med, 2003. **9**(1): p. 123-8.
7. Arridge, S.R., et al., *A finite element approach for modeling photon transport in tissue*. Med Phys, 1993. **20**(2 Pt 1): p. 299-309.
8. Arridge, S.R. and M. Schweiger, *Image reconstruction in optical tomography*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1997. **352**(1354): p. 717-26.
9. Aronson, R., *Boundary conditions for diffusion of light*. J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis, 1995. **12**(11): p. 2532-9.
10. O'Leary, M.A., *Imaging with diffuse photon density waves*. 1996, University of Pennsylvania.
11. Ripoll, J., *Light diffusion in turbid media with biomedical application*. 2000, Universidad Autonoma de Madrid.
12. Schweiger, M., et al., *The finite element method for the propagation of light in scattering media: boundary and source conditions*. Med Phys, 1995. **22**(11 Pt 1): p. 1779-92.
13. Boas, D., *Diffuse Photon Probes of Structural and Dynamical Properties of Turbid Media: Theory and Biomedical Applications*, in *Physics & Astronomy*. 1996, University of Pennsylvania: Philadelphia.

## Bibliografia

14. Haskell, R.C., et al., *Boundary conditions for the diffusion equation in radiative transfer*. J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis, 1994. **11**(10): p. 2727-41.
15. S.K. Gayen, A.R.R., *Biomedical imaging techniques*. Optics and photonics news, 1996(1): p. 10.
16. Yodh, A. and B. Chance, *Spectroscopic imaging with diffusing light*. Physics Today, 1995(48): p. 2.
17. Culver, J.P., et al., *Three-dimensional diffuse optical tomography in the parallel plane transmission geometry: evaluation of a hybrid frequency domain/continuous wave clinical system for breast imaging*. Med Phys, 2003. **30**(2): p. 235-47.
18. Boas, D., T. Gaudette, and S. Arridge, *Simultaneous imaging and optode calibration with diffuse optical tomography*. Opt Express, 2001. **8**(5): p. 263-70.
19. Ntziachristos, V., et al., *Imaging cathepsin B up-regulation in HT-1080 tumor models using fluorescence-mediated molecular tomography (FMT)*. Acad Radiol, 2002. **9 Suppl 2**: p. S323-5.
20. Ripoll, J., et al., *Fast analytical approximation for arbitrary geometries in diffuse optical tomography*. Opt Lett, 2002. **27**(7): p. 527-9.
21. Ripoll, J. and V. Ntziachristos, *Iterative boundary method for diffuse optical tomography*. J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis, 2003. **20**(6): p. 1103-10.
22. Ripoll, J. and V. Ntziachristos, *From finite to infinite volumes: removal of boundaries in diffuse wave imaging*. Phys Rev Lett, 2006. **96**(17): p. 173903.
23. Arridge, S.R., et al., *The finite element model for the propagation of light in scattering media: a direct method for domains with nonscattering regions*. Med Phys, 2000. **27**(1): p. 252-64.
24. Markel, V.A. and J.C. Schotland, *Inverse problem in optical diffusion tomography. I. Fourier-Laplace inversion formulas*. J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis, 2001. **18**(6): p. 1336-47.
25. Markel, V.A. and J.C. Schotland, *Inverse problem in optical diffusion tomography. II. Role of boundary conditions*. J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis, 2002. **19**(3): p. 558-66.
26. Ntziachristos, V. and R. Weissleder, *Experimental three-dimensional fluorescence reconstruction of diffuse media by use of a normalized Born approximation*. Opt Lett, 2001. **26**(12): p. 893-5.

27. Schulz, R.B., et al., *Hybrid system for simultaneous fluorescence and x-ray computed tomography*. IEEE Trans Med Imaging, 2010. **29**(2): p. 465-73.
28. Stuker, F., et al., *Hybrid Small Animal Imaging System Combining Magnetic Resonance Imaging With Fluorescence Tomography Using Single Photon Avalanche Diode Detectors*. IEEE Trans Med Imaging, 2011.
29. Yang, X., et al., *Combined system of fluorescence diffuse optical tomography and microcomputed tomography for small animal imaging*. Rev Sci Instrum, 2010. **81**(5): p. 054304.
30. Graves, E.E., et al., *Singular-value analysis and optimization of experimental parameters in fluorescence molecular tomography*. J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis, 2004. **21**(2): p. 231-41.
31. Culver, J.P., et al., *Optimization of optode arrangements for diffuse optical tomography: A singular-value analysis*. Opt Lett, 2001. **26**(10): p. 701-3.
32. Schulz, R.B., J. Ripoll, and V. Ntziachristos, *Experimental fluorescence tomography of tissues with noncontact measurements*. IEEE Trans Med Imaging, 2004. **23**(4): p. 492-500.
33. Wang, D., X. Liu, and J. Bai, *Analysis of fast full angle fluorescence diffuse optical tomography with beam-forming illumination*. Opt Express, 2009. **17**(24): p. 21376-95.
34. Lasser, T. and V. Ntziachristos, *Optimization of 360 degrees projection fluorescence molecular tomography*. Med Image Anal, 2007. **11**(4): p. 389-99.
35. Martin, A., et al., *Imaging changes in lymphoid organs in vivo after brain ischemia with three-dimensional fluorescence molecular tomography in transgenic mice expressing green fluorescent protein in T lymphocytes*. Mol Imaging, 2008. **7**(4): p. 157-67.
36. Zacharakis, G., et al., *Volumetric tomography of fluorescent proteins through small animals in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18252-7.
37. Garofalakis, A., et al., *Three-dimensional in vivo imaging of green fluorescent protein-expressing T cells in mice with noncontact fluorescence molecular tomography*. Mol Imaging, 2007. **6**(2): p. 96-107.
38. Ntziachristos, V., et al., *Visualization of antitumor treatment by means of fluorescence molecular tomography with an annexin V-Cy5.5 conjugate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(33): p. 12294-9.

## Bibliografia

39. Garofalakis, A., et al., *In vivo validation of free-space fluorescence tomography using nuclear imaging*. Opt Lett, 2010. **35**(18): p. 3024-6.
40. Koenig, A., et al., *In vivo mice lung tumor follow-up with fluorescence diffuse optical tomography*. J Biomed Opt, 2008. **13**(1): p. 011008.
41. Koenig, A., et al., *Fluorescence diffuse optical tomographic (fDOT) system for small animal studies*. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2007. **2007**: p. 2626-9.
42. Deliolanis, N., et al., *In-vivo lung cancer imaging in mice using 360 degrees free-space fluorescence molecular tomography*. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2006. **1**: p. 2370-2.
43. Alberts, B., et al., *Essential Cell Biology*. 2009, New York: Garland Publishing.
44. Born, M. and E. Wolf, *Principles of Optics*. 7 ed. 1999: University Press, Cambridge.
45. Bohren, C.F. and D.R. Huffman, *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. 1998: Wiley-Interscience.
46. Chandrasekhar, S., *Radiative Transfer*. 1960, New York: Dover.
47. Ishimaru, A., *Wave Propagation and Scattering in Random Media* 1978, New York: Academic.
48. L. G. Henyey, J.L.G., *Diffuse radiation in the galaxy*. Astro Physics Journal, 1941(93): p. 13.
49. M. C. W. van Rossum, a.T.M.N., *Multiple scattering of classical waves: microscopy, mesoscopy, and diffusion*. Rev. of Mod. Phys, 1999(71): p. 58.
50. Arridge, S.R., M. Hiraoka, and M. Schweiger, *Statistical basis for the determination of optical pathlength in tissue*. Phys Med Biol, 1995. **40**(9): p. 1539-58.
51. Ntziachristos, V., *Concurrent diffuse optical tomography, spectroscopy and magnetic resonance imaging of breast cancer*. 2000, University of Pennsylvania: Philadelphia.
52. K. M. Yoo, F. Liu, and R. R. Alfano, *When does the diffusion approximation fail to describe photon transport in random media?* Phys. Rev. Let., 1990(64): p. 3.
53. Arfken, G.B., *Mathematical methods for Physicists*. 1995, New York: Academic Press.

54. Garofalakis, A., et al., *Optical characterization of thin female breast biopsies based on the reduced scattering coefficient*. Phys Med Biol, 2005. **50**(11): p. 2583-96.
55. Patterson, M.S., *Time resolved reflectance and transmittance for the non-invasive measurements of tissue optical properties*. Applied Optics, 1989. **28**: p. 2331-2336.
56. Farrell, T.J., M.S. Patterson, and B. Wilson, *A diffusion theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for the noninvasive determination of tissue optical properties in vivo*. Med Phys, 1992. **19**(4): p. 879-88.
57. Graves, E.E., et al., *A submillimeter resolution fluorescence molecular imaging system for small animal imaging*. Med Phys, 2003. **30**(5): p. 901-11.
58. Sikora, J., et al., *Diffuse photon propagation in multilayered geometries*. Phys Med Biol, 2006. **51**(3): p. 497-516.
59. Elisee, J., A. Gibson, and S. Arridge, *Combination of Boundary Element Method and Finite Element Method in Diffuse Optical Tomography*. IEEE Trans Biomed Eng, 2010.
60. Corlu, A., et al., *Three-dimensional in vivo fluorescence diffuse optical tomography of breast cancer in humans*. Opt Express, 2007. **15**(11): p. 6696-716.
61. Soubret, A., J. Ripoll, and V. Ntziachristos, *Accuracy of fluorescent tomography in the presence of heterogeneities: study of the normalized Born ratio*. IEEE Trans Med Imaging, 2005. **24**(10): p. 1377-86.
62. Hyde, D., et al., *Performance dependence of hybrid x-ray computed tomography/fluorescence molecular tomography on the optical forward problem*. J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis, 2009. **26**(4): p. 919-23.
63. Ntziachristos, V., et al., *Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo*. Nat Med, 2002. **8**(7): p. 757-60.
64. Pogue, B.W. and M.S. Patterson, *Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry*. J Biomed Opt, 2006. **11**(4): p. 041102.
65. Patwardhan, S., et al., *Time-dependent whole-body fluorescence tomography of probe bio-distributions in mice*. Opt Express, 2005. **13**(7): p. 2564-77.
66. Ripoll, J., R.B. Schulz, and V. Ntziachristos, *Free-space propagation of diffuse light: theory and experiments*. Phys Rev Lett, 2003. **91**(10): p. 103901.

## Bibliografia

67. Schulz, R.B., J. Ripoll, and V. Ntziachristos, *Noncontact optical tomography of turbid media*. Opt Lett, 2003. **28**(18): p. 1701-3.
68. Meyer, H., et al., *Noncontact optical imaging in mice with full angular coverage and automatic surface extraction*. Appl Opt, 2007. **46**(17): p. 3617-27.
69. Deliolanis, N., et al., *Free-space fluorescence molecular tomography utilizing 360 degrees geometry projections*. Opt Lett, 2007. **32**(4): p. 382-4.
70. T Correia, J.A., A Sisniega, J Chamorro-Servent, J Abascal, JJ Vaquero, M Desco, V Kolehmainen, S Arridge., *Split operator method for fluorescence diffuse optical tomography using anisotropic diffusion regularisation with prior anatomical information*. Biomedical Optics Express., 2011. **2**(9): p. 16.
71. Aguirre J, et al., *Design and development of a co-planar fluorescence and X-ray tomograph*. IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record, 2008: p. 1.
72. Hyde, D., et al., *Data specific spatially varying regularization for multimodal fluorescence molecular tomography*. IEEE Trans Med Imaging, 2010. **29**(2): p. 365-74.
73. Hadamard, J., *Sur les problèmes aux dérivées partielles et leur signification physique*. 1902: p. 3.
74. Arridge, S.R., *Optical tomography in medical imaging*. Inverse Problems, 1999(15): p. 52.
75. Vogel, C.R., *Computational Methods for Inverse Problems*. 2002, Philadelphia: SIAM.
76. Chamorro-Servent, J., et al., *Feasibility of U-curve method to select the regularization parameter for fluorescence diffuse optical tomography in phantom and small animal studies*. Opt Express, 2011. **19**(12): p. 11490-506.
77. Hanke and Hansen, *Regularization methods for large scale problems*., Surveys on Mathematics for Industry, 1993(3): p. 62.
78. Ntziachristos, V., J. Ripoll, and R. Weissleder, *Would near-infrared fluorescence signals propagate through large human organs for clinical studies?* Opt Lett, 2002. **27**(5): p. 333-5.
79. Pogue, B.W., et al., *Spatially variant regularization improves diffuse optical tomography*. Appl Opt, 1999. **38**(13): p. 2950-61.



80. Soubret, A. and V. Ntziachristos, *Fluorescence molecular tomography in the presence of background fluorescence*. Phys Med Biol, 2006. **51**(16): p. 3983-4001.
81. Gordon, R., R. Bender, and G.T. Herman, *Algebraic reconstruction techniques (ART) for three-dimensional electron microscopy and x-ray photography*. J Theor Biol, 1970. **29**(3): p. 471-81.
82. Herman, G.T. and L.B. Meyer, *Algebraic reconstruction techniques can be made computationally efficient [positron emission tomography application]*. IEEE Trans Med Imaging, 1993. **12**(3): p. 600-9.
83. Ros, D., et al., *The influence of a relaxation parameter on SPECT iterative reconstruction algorithms*. Phys Med Biol, 1996. **41**(5): p. 925-37.
84. Strand , O.N., *Theory and methods related to the singular-function expansion and Landweber's iteration for integral equations of the first kind*. SIAM J.Numer.Anal, 1974. **11**(4): p. 798-825.
85. Intes, X., et al., *Projection access order in algebraic reconstruction technique for diffuse optical tomography*. Phys Med Biol, 2002. **47**(1): p. N1-10.
86. Brendel, B., R. Ziegler, and T. Nielsen, *Algebraic reconstruction techniques for spectral reconstruction in diffuse optical tomography*. Appl Opt, 2008. **47**(34): p. 6392-403.
87. Arridge, S.R. and J.C. Schotland, *Optical tomography: forward and inverse problems*. Inv. Problems, 2009. **25**(12): p. 123010.
88. Tarvainen, T., et al., *Corrections to linear methods for diffuse optical tomography using approximation error modelling*. Biomed Opt Express, 2010. **1**(1): p. 209-222.
89. Wai-Fung Cheong, Scott A. Prahl, and A.J. Welch, *A review of the optical properties of biological tissues*. IEEE Journal of quantum electronics, 1990. **26**(12): p. 19.
90. Ntziachristos, V., et al., *Diffuse optical tomography of highly heterogeneous media*. IEEE Trans Med Imaging, 2001. **20**(6): p. 470-8.
91. Cubbedu, R., *A solid tissue phantom for migration studies*. Phys Med Biol, 1997. **42**: p. 1971-1979
92. Dogdas, B., et al., *Digimouse: a 3D whole body mouse atlas from CT and cryosection data*. Phys Med Biol, 2007. **52**(3): p. 577-87.

## Bibliografia

93. Di Ninni, P., F. Martelli, and G. Zaccanti, *Effect of dependent scattering on the optical properties of Intralipid tissue phantoms*. Biomed Opt Express, 2011. **2**(8): p. 2265-78.
94. Barिताux, J.C., et al., *Sparsity-driven reconstruction for FDOT with anatomical priors*. IEEE Trans Med Imaging, 2011. **30**(5): p. 1143-53.
95. Li, A., et al., *Optimal linear inverse solution with multiple priors in diffuse optical tomography*. Appl Opt, 2005. **44**(10): p. 1948-56.
96. Joshi, A., W. Bangerth, and E. Sevick-Muraca, *Adaptive finite element based tomography for fluorescence optical imaging in tissue*. Opt Express, 2004. **12**(22): p. 5402-17.
97. Zacharopoulos, A.D., et al., *A matrix-free algorithm for multiple wavelength fluorescence tomography*. Opt Express, 2009. **17**(5): p. 3025-35.
98. Guo, X., et al., *A combined fluorescence and microcomputed tomography system for small animal imaging*. IEEE Trans Biomed Eng, 2010. **57**(12): p. 2876-83.
99. Lasser, T., et al., *Surface Reconstruction for free-space 360 degrees fluorescence molecular tomography and the effects of animal motion*. IEEE Trans Med Imaging, 2008. **27**(2): p. 188-94.
100. Lage, E., et al., *Design and performance evaluation of a coplanar multimodality scanner for rodent imaging*. Phys Med Biol, 2009. **54**(18): p. 5427-41.
101. Cao, L., M. Breithaupt, and J. Peter, *Geometrical co-calibration of a tomographic optical system with CT for intrinsically co-registered imaging*. Phys Med Biol, 2010. **55**(6): p. 1591-606.
102. Turbell, H., *Cone-beam Reconstruction using Filtered backprojection*, in *Department of Electrical Engineering*. 2001, Linköpings universitet: Linköping, Sweden.
103. Arun, H. T.S, and B. S.D, *Least- Squares Fitting of two 3-D point sets*. IEEE TRANSACTIONS ON PATTERN ANALYSIS AND MACHINE INTELLIGENCE, 1987. **5**: p. 2.
104. Koenig, A., et al., *Fluorescence diffuse optical tomography for free-space and multifluorophore studies*. J Biomed Opt, 2010. **15**(1): p. 016016.
105. Tsai, *A Versatile Camera Calibration Technique for High-Accuracy 3d Machine Vision Metrology Using Off-the-Shelf Tv Cameras and Lenses*. IEEE Journal of Robotics and Automation, 1987. **3**(4): p. 21.

106. Ortuño, J., *Comunicación interna*. Facultad de Ingeniería de Telecomunicaciones, Universidad Politécnica de Madrid, 2011.
107. Laurentini, A., *The Visual Hull Concept for Silhouette-Based Image Understanding*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 1994. **16**(2): p. 12.
108. Pogue, B.W., et al., *Image analysis methods for diffuse optical tomography*. J Biomed Opt, 2006. **11**(3): p. 33001.
109. Jain, R.K., L.L. Munn, and D. Fukumura, *Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 266-76.
110. Zacharakis, G., et al., *Fluorescent protein tomography scanner for small animal imaging*. IEEE Trans Med Imaging, 2005. **24**(7): p. 878-85.
111. de Boer J, Williams A, and Skavdis G, *Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre*. Eur J Immunol 2003. **33**: p. 11.
112. Deliolanis, N.C., et al., *Performance of the red-shifted fluorescent proteins in deep-tissue molecular imaging applications*. J Biomed Opt, 2008. **13**(4): p. 044008.